

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Darstellung apoptotischer und nekrotischer
Rattenhepatozyten im Gewebeschnitt
nach verschiedenen Fixierungsverfahren und
mittels unterschiedlicher Nachweismethoden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
BIRGIT ANJA BLAZEY

Gießen 2002

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

**Darstellung apoptotischer und nekrotischer
Rattenhepatozyten im Gewebeschnitt
nach verschiedenen Fixierungsverfahren und
mittels unterschiedlicher Nachweismethoden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
BIRGIT ANJA BLAZEY
Tierärztin aus Höchstadt/A. (Bayern)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 09. April 2002

Was ist das Schwerste von allem?
Was dir das Leichteste dünket:
Mit den Augen zu sehen,
was vor den Augen dir liegt.“
J. W. von Goethe

meiner Mutter,
meinen Schwestern
und M. Ende

Inhaltsübersicht

Kapitel		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1.	Definition der Apoptose	4
2.2.	Genetische, molekulare und biochemische Charakteristika der Apoptose	5
2.2.1.	Rezeptor- und Ligand-vermittelte Apoptose	6
2.2.1.1.	Fas/Fas-Ligand (APO-1; CD 95/FasL)	6
2.2.1.2.	Tumor Nekrose Faktor (TNF)	9
2.2.1.3.	“TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL/APO-2)	11
2.2.2.	Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von den Mitochondrien	11
2.2.3.	Aktivierung von Enzymen der Fas/FasL-Kaskade unabhängig von Rezeptoren	12
2.2.4.	DNS-Fragmentierung	12
2.2.5.	Die B-Zell-Leukämie/Lymphom-2-Gen (bcl2)-Familie	13
2.2.6.	Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)	16
2.2.7.	Das p53-Gen und -Protein	17
2.3.	Nomenklatur der Apoptose	19
2.4.	Funktion und Vorkommen der Apoptose	22
2.4.1.	Apoptose in der normalen Leber	22
2.4.2.	Apoptose im Rahmen der Involution und Atrophie der Leber nach Cyproteronacetat-Applikation	24
2.4.3.	Einfluss auf die Apoptose durch Nährstoffzufuhr und Tag-Nacht-Rhythmus	26
2.4.4.	Apoptose nach toxischer Leberschädigung	26
2.5.	Apoptoserate und Nettoproliferationsrate	27
2.6.	Andere Formen des aktiven Zelltodes	29
2.7.	Charakteristika der Apoptose und ihre Nachweismethoden	33
2.7.1.	Elektronenmikroskopie	33
2.7.2.	Standard-Lichtmikroskopie	34
2.7.3.	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.7.4.	Nachweis der DNS-Fragmente	36
2.7.4.1.	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.7.4.2.	In situ-Nachweis der DNS-Fragmente	37
2.7.5.	Durchflusszytometrie	40
2.7.6.	Annexin-Fluoreszein-Isothiozyanat und Propidiumjodid	41

2.7.7.	Wachstumsfaktoren, Gene und Proteine	42
3.	MATERIAL UND METHODEN	44
3.1.	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	44
3.2.	Behandlung und Tötung der Versuchstiere	44
3.3.	Histologische Methoden	46
3.3.1.	Probenentnahme/-fixierung	46
3.3.2.	Einbettung der Organe	46
3.3.3.	Herstellung der histologischen Präparate	47
3.3.3.1.	Wässrige Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Standard-H&E)	48
3.3.3.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	48
3.3.3.3.	Alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (alkoholische H&E)	49
3.3.3.4.	Fett- und Glykogendarstellung	50
3.4.	Auswertungsstrategien	51
3.4.1.	Hilfsmittel zur Auswertung	51
3.4.2.	Auswahl der Messfelder	51
3.4.3.	Apoptose- und Nekrose-Indizes	52
3.4.4.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hä- matoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	52
3.4.5.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	53
3.4.6.	Eosinfloureszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	54
3.5.	Statistische Auswertung	54
4.	ERGEBNISSE	56
4.1.	Pathohistologische Untersuchung	56
4.2.	Ergebnisse der Vorversuche	58
4.2.1.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	58
4.2.2.	Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Standard-H&E)	58
4.2.3.	Alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (alkoholische H&E) zur Darstellung der Eosinfloureszenz	59
4.3.	Ergebnisse der Hauptversuche	61
4.3.1.	Darstellung der Apoptosen und Nekrosen	61
4.3.1.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hä- matoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	61

4.3.1.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	65
4.3.1.3.	Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	65
4.3.2.	Apoptose- und Nekrose-Indizes der Einzeltiere	67
4.3.3.	Vergleich der Methoden für den Nachweis der Apoptose	68
4.3.3.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	68
4.3.3.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	71
4.3.3.2.1.	TUNEL - Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen	71
4.3.3.2.2.	TUNEL-positive, morphologisch unveränderte Hepatozyten und TUNEL-positive, nicht-hepatozelluläre Signale	76
4.3.3.2.3.	Apoptose-Indizes mit der TUNEL-Methode	81
4.3.3.3.	Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	82
4.3.3.3.1.	Nicht-apoptotische fluoreszierende Signale	82
4.3.3.3.2.	Apoptose-Indizes mit der Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	84
4.3.4.	Anstieg der Apoptose-Indizes nach Cyproteronacetat-Entzug	86
4.3.5.	Apoptose-Indizes mit der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz-Methode im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung)	88
4.3.6.	Gegenüberstellung der Methoden für den Nachweis der Nekrosen	90
4.3.6.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	91
4.3.6.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	92
4.3.6.3.	Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische H&E-Färbung)	93
4.3.6.4.	Nekrose-Indizes mit der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz-Methode im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung)	94
5.	DISKUSSION	97
5.1.	Adaptation der Versuchstiere an einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus bei kontrollierter Fütterung	97
5.2.	Auswertungsstrategien	98

5.3.	Vergleich der ermittelten Apoptose-Indizes	99
5.3.1.	Apoptose-Indizes bei den Kontrollen	99
5.3.1.1.	Apoptose-Indizes der Einzeltiere	99
5.3.1.2.	Vergleich mit den Daten aus der Literatur	99
5.3.2.	Apoptose-Indizes bei den Dosisgruppen (CPA-2-Tage- und CPA-4-Tage-Gruppe)	101
5.3.2.1.	Apoptose-Indizes der Einzeltiere	101
5.3.2.2.	Vergleich mit den Daten aus der Literatur	102
5.4.	Nachweismethoden der Apoptose	104
5.4.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	105
5.4.1.1.	Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)	106
5.4.1.2.	Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale	107
5.4.1.3.	Erkennen anderer unerwünschter Signale	108
5.4.1.4.	Einfluss des Fixierungsmittels	109
5.4.1.5.	Einfluss der Fixierungszeit	109
5.4.2.	Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	111
5.4.2.1.	Einfluss des Fixierungsmittels und der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung)	111
5.4.2.2.	Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen, apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)	112
5.4.2.3.	Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale	115
5.4.2.4.	Erkennen anderer unerwünschter Signale	115
5.4.2.5.	Einfluss der Fixierungszeit	116
5.4.3.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	117
5.4.3.1.	Einfluss der Vorbehandlung der Präparate auf die Darstellung der Apoptosen	117
5.4.3.2.	Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)	118
5.4.3.3.	Weitere positive TUNEL-Signale (Zytoplasmafärbung: unerwünschtes oder mit der Apoptose im Zusammenhang stehendes Signal?) in Hepatozyten	119
5.4.3.4.	Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale	121
5.4.3.5.	Erkennen anderer unerwünschter Signale	122
5.4.3.6.	Einfluss des Fixierungsmittels	123
5.4.3.7.	Einfluss der Fixierungszeit	123

5.5.	Vergleich der Nachweismethoden der Apoptose	125
5.5.1.	Darstellung der Apoptosen	125
5.5.2.	Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale	128
5.5.3.	Erkennen anderer unerwünschter Signale	129
6.	ZUSAMMENFASSUNG	130
7.	SUMMARY	132
8.	ANHANG	134
8.1.	Abbildungen	134
8.2.	Tabellen zu den Ergebnissen aus dem Nachweis von Apoptosen mit der Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), der TUNEL- und der Eosinfluoreszenz-Methode	136
8.2.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)	136
8.2.1.1.	Einzeltierdaten - Apoptotische Zellen und Körperchen (mit und ohne Chromatin) sowie Apoptose-Indizes (in Prozent)	136
8.2.1.1.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	136
8.2.1.1.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	138
8.2.1.1.3.	Carnoy-Fixierung und alkoholische H&E-Färbung	139
8.2.1.2.	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)	141
8.2.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	142
8.2.2.1.	Einzeltierdaten	142
8.2.2.1.1.	Intensität der Färbung der TUNEL-positiven apoptotischen Zellen und Körperchen	142
8.2.2.1.1.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung	142
8.2.2.1.1.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung	144
8.2.2.1.2.	Apoptose-Indizes (AI) der Einzeltiere in Prozent	146
8.2.2.1.3.	TUNEL-positive und -negative Apoptosen	147
8.2.2.1.3.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung	147
8.2.2.1.3.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung	148
8.2.2.1.4.	Weitere TUNEL positive Signale (TUNEL-positive Apoptosen, TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten und TUNEL-positive nicht-Hepatozyten)	150
8.2.2.1.4.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung	150

8.2.2.1.4.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung	152
8.2.2.2.	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)	154
8.2.3.	Eosinfloureszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung	154
8.2.3.1.	Einzeltierdaten - Apoptotische Zellen und Körperchen (mit und ohne Chromatin) sowie Apoptose-Indizes (in Prozent)	154
8.2.3.2.	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)	156
8.3.	Anstiegsfaktoren der Apoptose-Indizes	157
8.4.	Tabellen zu den Ergebnissen aus dem Nachweis der Nekrosen mit der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), der TUNEL- und der Eosinfloureszenz-Methode	158
8.4.1.	Einzeltierdaten - Nekrotische Zellen (mit und ohne Chromatin) sowie Nekrose-Indizes (in Prozent)	158
8.4.1.1.	Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung	158
8.4.1.1.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	158
8.4.1.1.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	159
8.4.1.1.3.	Carnoy-Fixierung und alkoholische-H&E-Färbung	160
8.4.1.2.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)	161
8.4.1.2.1.	Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	161
8.4.1.2.2.	Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung	162
8.4.1.3.	Eosinfloureszenz-Methode und Carnoy-Fixierung	163
8.4.2.	Nekrose-Indizes der Versuchstiergruppen	165
8.5.	Eingesetzte Materialien	166
8.5.1.	Fixierung und Paraffinierung	166
8.5.2.	Lösungen, Puffer, Bezugsquellen	166
8.5.2.1.	Lösungen und Puffer	166
8.5.2.2.	Bezugsquellen	169
9.	LITERATURVERZEICHNIS	172

Abkürzungsverzeichnis

α -HCH	α -Hexachlorcyclohexan
AB	Apoptotische/s Körperchen (apoptotic body/-ies)
Abb.	Abbildung
AC	Apoptotische Zelle (apoptotic cell)
AF	Anstiegsfaktor
AF-2-Tage	Anstiegsfaktor der Indizes von der Kontrollgruppe auf die CPA-2-Tage-Gruppe
AF-4-Tage	Anstiegsfaktor der Indizes von der Kontrollgruppe auf die CPA-4-Tage-Gruppe
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AI	Apoptose-Index
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Alkoholische H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung unter Verwendung einer alkoholischen Eosinlösung
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
apaf-1	“apoptotic protease activating factor 1”
ATP	Adenosin-Triphosphat
Aufl.	Auflage
BH	bcl ₂ -Homologiedomäne(n)
bp	Basenpaare
BrdU	5´-Bromo-2-desoxyuridin
Ca ²⁺	Kalziumionen
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CdK	“cyclin-dependent kinase” (Cyclin-abhängige Kinase)
CPA	Cyproteronacetat
CPA-2-Tage	Versuchstiergruppe, welche 2 Tage nach CPA-Entzug getötet wurde
CPA-4-Tage	Versuchstiergruppe, welche 4 Tage nach CPA-Entzug getötet wurde
DAB	Deutsches Arzneibuch
DD	“death domain”
DISC	“death-inducing signaling complex”
DNA	“deoxyribonucleic acid”
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	“double-stranded” (Doppelstrang)
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat

EE	Ethinyl-Estradiol
EF	Eosinfluoreszenz
E2F	Transkriptionsfaktor
EM	Elektronenmikroskop/-ie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteri
F344	Fischer 344 Ratten
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit "death domain"
FasL	Fas-Ligand
FLICE	"FADD-like ICE"
FM	Fluoreszenzmikroskop/-ie
FS	Fluoreszierende nicht-apoptotische bzw. fragliche Signale
GADD	"Growth arrest DNA damage inducible"
H1, H2A, H2B, H3, H4	Histone
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Salzsäure
HL60	promyelozytische Leukämiezelllinie
i.p.	intraperitoneal
ICE	"Interleukin 1 β converting-Enzym" (Kaspase-1)
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
KGW	Körpergewicht
LM	Standard-Lichtmikroskop/-ie
LZM	"Lobule-dependent zonal measurement"
MCF-7	Humane Brustkrebszellen
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MOLT 4	humane lymphatische Leukämiezelllinie
mRNS	"messenger" Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NF- κ B	"nuclear factor- κ B"
NI	Nekrose-Index
N-OH-AAF	N-Hydroxy-2-Acetylamino-Fluoren
OH	Hydroxylgruppe
ORO	Oil-Red-O-Färbung
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PB	Phenobarbital
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCD	"Programmed cell death"

PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen”
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
PT	“permeability transition” (Permeabilitätsänderung)
R	Rezeptor
RIP	“receptor interacting protein”
RNS	Ribonukleinsäure
SPF	“specific pathogen free”
Standard-H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung unter Verwendung einer wässrigen Eosinlösung
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
tdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (kurz: terminale Transferase)
TGF- β_1	“Transforming growth factor β_1 ”
TGF- β -LAP	“Transforming growth factor β latent associated protein”
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor Typ 1
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit “death domain”
TRAIL/APO-2	“TNF-related apoptosis-inducing ligand”
TUNEL oder TU	“Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling”

1. Einleitung

Die Apoptose ist ein phylogenetisch altes Phänomen, das bei einer Vielzahl von Tieren, hierunter auch niedere Tiere wie zum Beispiel Insekten oder dem vielfach erforschten Nematoden *Caenorhabditis elegans* und auch bei Pflanzen beobachtet wird (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1992; HENGARTNER et al., 1992; YUAN et al., 1993; GREENBERG et al., 1994). Sie fungiert als Gegenspieler der Mitose und dient der Eliminierung unerwünschter Zellen wie zum Beispiel geschädigter, überschüssiger oder präkanzeröser Zellen (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1992). Somit spielt diese Form des Zelltodes bei vielen physiologischen und pathologischen Zuständen eine wichtige Rolle (ARENDS et al., 1990). Die Apoptose stellt das morphologische Erscheinungsbild einer aktiven, genetisch programmierten Reaktionskaskade zur Selbstzerstörung von Zellen dar (BURSCH et al., 1994; SCHULTE-HERMANN et al., 1997). Die gleichartigen Veränderungen des Zytoplasmas und des Zellkernes in vielen verschiedenen Geweben erlauben keine morphologische Differenzierung der Apoptosen bei unterschiedlichen Zelltypen (ALISON und SARRAF, 1995).

In der Tumorforschung wurde beobachtet, dass präneoplastische Herde in der Leber zum Teil verschwinden und Tumoren trotz hoher Mitoserate ein verlangsamtes, ausbleibendes oder gar rückläufiges Wachstum aufweisen (SCHULTE-HERMANN et al., 1993; GRASL-KRAUPP, 1997; FOSTER, 2000). In Folge dessen wurde erkannt, dass nicht nur die Zellproliferation in der chemischen Karzinogenese eine Schlüsselrolle besitzt, sondern dass auch dem Zelltod in Form der Apoptose eine wichtige Funktion in der Tumorentwicklung zugesprochen werden muss. So wird z.B. das fokale Wachstum in der Leber nicht nur durch eine selektiv gesteigerte Proliferation, sondern ebenso durch eine Hemmung der Apoptose in diesen präneoplastischen Hepatozyten begünstigt. Ebenso kann die Hemmung der Proliferation in dem umgebenden extrafokalen Lebergewebe zu einem Wachstumsvorteil der präneoplastischen Herde führen (GOLDSWORTHY et al., 1995). Ob gleichfalls eine erhöhte Apoptoserate der extrafokalen Hepatozyten diesen Vorteil verstärken kann, ist derzeit noch unbekannt. Es wird allerdings von einer höheren Apoptoserate in den präneoplastischen Herden gegenüber dem extrafokalen Lebergewebe berichtet (SCHULTE-HERMANN et al., 1988; BURSCH et al., 1992).

Durch die Untersuchung des physiologischen Zelltodes, der Apoptose, und der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen erhofft man sich, einige Krankheiten, bei denen die Regulation der Apoptose gestört ist (z.B. Tumoren (zu wenig Zelluntergänge) oder AIDS (zu viele Zelluntergänge)), in der Zukunft therapeutisch beeinflussen zu können (BURSCH et al., 1992; DUKE et al., 1997). Um die Funktion, die Be-

einflussung und die Auswirkung der Apoptose deuten zu können, sind zunächst fundierte Kenntnisse über das Auftreten der Apoptose vonnöten. Dies bezieht sich auf die normale embryonale Entwicklung, auf den wachsenden sowie den adulten Organismus und auf Veränderungen in Folge physiologischer und pathologischer Stimuli (NUSSBAUM, 1901; GLÜCKSMANN, 1930; LOCKSHIN und WILLIAMS, 1965; SCHWEICHEL und MERKER, 1973; WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1992; SCHULTE-HERMANN et al., 1995b). Ohne die Aufklärung der Steuerung des Vorganges auf zellulärer sowie biochemischer Seite sowie ohne geeignete Nachweissysteme an Gewebeschnitten, sind derartige Ziele nicht zu erreichen.

Die Forschungsk Kooperation zwischen der Abteilung Toxikologie der BASF AG und dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen hat sich zur Aufgabe gestellt, aus einer Auswahl der in der Literatur beschriebenen Nachweissysteme eine geeignete Methode für die eigene Fragestellung hinsichtlich der Pathogenese der Hepatokarzinogenese zu ermitteln. Die Methode soll schließlich im Rahmen der Entwicklung eines Kurzzeittestes zur Bestimmung des karzinogenen Potentials verschiedener Rattenlebermitogene eingesetzt werden, um neben Proliferationsmessungen zusätzlich die Apoptose-Indizes zu bestimmen (BLAZEY et al., 1999; HEUSER, 2000; BURKHARDT, 2001; Stephan, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das am besten anwendbare Nachweissystem für die quantitative Bestimmung der Apoptoserate von Rattenhepatozyten ausgewählt werden. Eine der Voraussetzungen für die Nachweismethode war folglich die Einsatzmöglichkeit an Gewebeschnitten.

Als geeignet erschien eine Methode für den Nachweis der Apoptose in Hinsicht auf die Anwendung in der Routinediagnostik, wenn sie möglichst spezifisch und sensitiv, schnell und einfach durchzuführen sowie kostengünstig ist. Hierfür erfolgte eine Gegenüberstellung von folgenden drei Nachweismethoden:

- a) Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Standard-H&E) in Kombination mit der Standard-Lichtmikroskopie
- b) TUNEL-Methode (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling) in Kombination mit der Standard-Lichtmikroskopie
- c) alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Eosinfluoreszenz.

Darüber hinaus sollten Erkenntnisse über

- a) den Einfluss des Fixierungsmittels (reine Formaldehyd-Fixierung, 1 Tag Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol, Carnoy-Fixierung) und
- b) der Fixierungszeit

auf die Sensibilität und Spezifität der Methoden gewonnen werden.

Um aus den beschriebenen Nachweissystemen der Apoptose eine geeignete Methode auswählen zu können, sind möglichst hohe Apoptose-Indizes von Vorteil. Diese Voraussetzung ist in der Rattenleber von Kontrolltieren mit einem Apoptose-Index von 0,01%-0,05% (SCHULTE-HERMANN et al., 1995a) bzw. 0%-0,1% (BURSCH et al., 1990) nicht gegeben. Durch den Entzug eines Lebermitogens z.B. Cyproteronacetat (CPA), durch welches zuvor eine Leberhyperplasie induziert wurde, kann die Apoptoserate experimentell verstärkt werden (BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; GRASL-KRAUPP et al., 1995; ROBERTS et al., 1995). In dem hier durchgeführten Apoptoseinduktions-Protokoll erschienen weibliche Wistar-Ratten aufgrund einer stärkeren vorhergehenden Proliferation im Vergleich zu männlichen Tieren (SCHULTE-HERMANN et al., 1980) weitaus geeigneter.

2. Literaturübersicht

2.1. Definition der Apoptose

Der aus dem griechischen stammende Begriff "Apoptose" beschreibt das Abfallen welcher Blätter von einem Baum ("apo" - ab, weg, los; "ptosis"- Senkung) (KERR et al., 1972). Unter Apoptose versteht man die genetisch kodierte, aktive Selbstzerstörung der Zelle. In der Regel sind verstreute Einzelzellen betroffen, weshalb keine Veränderung der Gewebearchitektur zu erwarten ist. Die ursprüngliche Definition der Apoptose basierte auf morphologischen Kriterien (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1994). Die Hauptcharakteristika sind die Zytoplasmakondensation, die sichel- oder halbmondförmige Kondensation des Chromatins an der Kernmembran sowie die Fragmentation der Zelle und des Kernes unter Bildung apoptotischer Körperchen (AB). Als solche können sie extrazellulär oder intrazellulär als phagozytierte Partikel in Makrophagen oder – am Beispiel der Leber - in benachbarten Hepatozyten gefunden werden. In den frühen Phasen der Apoptose bleiben die Zellorganellen einschließlich der Plasmamembran funktionsfähig, so dass keine Freisetzung von Zellbestandteilen in die Umgebung erfolgt. Eine entzündliche Reaktion wird daher in der Regel nicht beobachtet. Dieses Kriterium wird häufig zur Abgrenzung der Apoptose von der Nekrose verwandt. Erst in späten Phasen führen die Lysosomen der phagozytierenden Zellen zu einer Degradierung der apoptotischen Körperchen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1995), wobei auch die Plasmamembran und die Membranen der Organellen ihre Integrität verlieren. Die apoptotischen Körperchen und die enthaltenen Organellen, z.B. Mitochondrien, schwellen und die AB erhalten ein vakuoläres Erscheinungsbild, das an eine leere Hülle erinnert (KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Die letztgenannten Reaktionen entsprechen denen der Nekrose, weshalb der Begriff der "sekundären" bzw. "apoptotischen Nekrose" eingeführt wurde (KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; MAJNO und JORIS, 1995). Bei ausbleibender Phagozytose treten derartige Veränderungen in Zellkulturen und -suspensionen auch bei kompletten apoptotischen Zellen sowie bei extrazellulären apoptotischen Körperchen auf (WYLLIE et al., 1980; MAJNO und JORIS, 1995).

Nähere Einzelheiten über das morphologische Erscheinungsbild der Apoptose werden in den Kapiteln 2.7.1. und 2.7.2. beschrieben.

2.2. Genetische, molekulare und biochemische Charakteristika der Apoptose

Der apoptotische Zelltod wird durch eine große Anzahl von überwiegend in der Evolution konservierten Genen reguliert, deren Proteinprodukte als molekulare Weichen zur Induktion oder Hemmung der Apoptose gelten. Bei der Entscheidung, ob die Zelle überlebt oder untergeht, spielen nicht nur endogene, sondern auch exogene Signale eine Rolle. Die einzelnen Signale können bei verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Wirkungen zeigen (HEDGECOCK et al., 1983; SULSTON et al., 1983; ELLIS und HORVITZ, 1986; YUAN und HORVITZ, 1990; HENGARTNER et al., 1992; VAUX et al., 1992; YUAN et al., 1993; HENGARTNER und HORVITZ, 1994; HORVITZ et al., 1994; STELLER, 1995; SHAHAM, 1998).

Bei der Regulation der Apoptose stellen intrazelluläre Zystein-Proteinasen, die sogenannten Kaspasen, die Haupteffektormoleküle dar. Sie werden wiederum durch andere Moleküle aktiviert und/oder reguliert (YIN, 2000). Kaspasen werden als Vorläufermoleküle synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert, wobei ihnen als Substrat wiederum Kaspasen oder andere zelluläre Proteine dienen (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998).

In Säugetierzellen sind zwei Hauptreaktionswege der Apoptoseinduktion bekannt: Der eine ist abhängig von der Aktivierung von Rezeptoren, der andere involviert hauptsächlich die Mitochondrien (YIN, 2000). Eine strikte Trennung ist hier allerdings nicht möglich (SUN et al., 1999; KAPLOWITZ, 2000). Wichtige Komponenten des Apoptoseprogramms sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Wichtige Komponenten des Apoptoseprogramms (modifiziert nach KAPLOWITZ, 2000)

1) "death-inducing signaling complex" (DISC)
♦ "Todesrezeptoren" (TNF-Rezeptor-Familie): Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2
♦ FADD, TRADD und RIP
♦ Prokaspase-8
2) Kaspasen
♦ Initiator- oder Signalkaspasen (Kaspase-2, -8, -9 und -10)
♦ Effektorkaspasen (Kaspase-3, -6, -7)
3) Mitochondrien
♦ ATP
♦ Cytochrom C
♦ AIF, Prokaspasen-2 und -9
♦ Permeabilitätsänderung ("permeability transition" (PT))
4) Apoptosom
♦ apaf-1
♦ Cytochrom C
♦ Prokaspase-9
♦ ATP
5) bcl ₂ -Familie
♦ proapoptotisch (bid, bax, bad)
♦ antiapoptotisch (bcl ₂ , bcl-x _L)
6) Ceramid

TNF – Tumor Nekrose Faktor; TNF-R1 – Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor Typ 1; TRAIL – "TNF-related apoptosis-inducing ligand"; DD - "death domain"; FADD - "Fas-associated protein with DD"; TRADD - TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit "DD"; RIP - "receptor interacting protein"; ATP – Adenosin-Triphosphat; AIF – Apoptose-induzierender Faktor; apaf-1 – "apoptotic protease activating factor 1"

2.2.1. Rezeptor- und Ligand-vermittelte Apoptose

2.2.1.1. Fas/Fas-Ligand (APO-1; CD 95/FasL)

Fas, ein Membranprotein und Mitglied der "tumor necrosis factor (TNF)/nerv-growth factor"-Rezeptor Familie (ITOH et al., 1991; OEHM et al., 1992; SUDA et al., 1993), induziert die Apoptose nach Bindung mit dem Fas-Liganden (FasL) oder mit agonistischen Antikörpern (TRAUTH et al., 1989; YONEHARA et al., 1989; SUDA et al., 1993; ADACHI et al., 1995) (siehe Abb. 1). Der Fas-Reaktionsweg dient primär der Eliminierung autoreaktiver und chronisch aktivierter T-Lymphozyten (ITOH et al.,

1991). Dementsprechend werden sowohl Fas als auch FasL hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten gebildet (SUDA et al., 1993; JU et al., 1995; TANAKA et al., 1995; NAGATA, 1997). Fas mRNA wird jedoch auch in den meisten anderen Organen und Zellen, am stärksten in Thymus, Herz, Leber, Niere und Ovarien nachgewiesen (WATANABE-FUKUNAGA et al., 1992; LEITHÄUSER et al., 1993; HIRAMATSU et al., 1994). Eine verstärkte Fas-Expression oder die Injektion von anti-Fas-Antikörpern in Mäuse führt zu Hepatitis (OGASAWARA et al., 1993; HIRAMATSU et al., 1994) und Fas-defiziente Mäuse weisen neben einer Lymphadenopathie und Splenomegalie auch eine Hyperplasie der Hepatozyten auf (ADACHI et al., 1995).

Das Fas-Protein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne. Die Letztgenannte ist bei der Übertragung des Todesignals essentiell und wird als "death domain" (DD) oder "death effector domain" (DED) bezeichnet (ITOH et al., 1991; OEHM et al., 1992; ITOH und NAGATA, 1993; TARTAGLIA et al., 1993a; BOLDIN et al., 1995a; NAGATA, 1997). An die DD des Fas-Proteins binden zytoplasmatische Proteine, die ebenfalls mit einem DD-Motiv ausgestattet sind, das sogenannte "Fas-associated protein with DD" (FADD/MORT1) (BOLDIN et al., 1995b; CHINNAIYAN et al., 1995; CLEVELAND und IHLE, 1995) oder das "receptor interacting protein" (RIP) (STANGER et al., 1995).

Die Bindung eines Komplexes von drei FasL induziert eine Trimerbildung von Fas-Molekülen. Nach der Bindung von FADD oder RIP an ein Fas-Trimer über die zytoplasmatisch gelegenen "death domains" folgt eine Auslösung der Apoptose über die Aktivierung von Interleukin 1 β converting-Enzym (ICE)-ähnlichen Zystein-Proteasen (siehe unten), den Kaspasen (ENARI et al., 1995; LOS et al., 1995; TEWARI und DIXIT, 1995), durch proteolytische Spaltung (CHINNAIYAN et al., 1996; DUAN et al., 1996). Eine dieser Proteasen enthält eine Domäne, die zu FADD homolog ist, und daher "FADD-like ICE" (FLICE; Kaspase-8) genannt wird (MUZIO et al., 1996). Die Vorstufe, die Prokaspase-8, bildet zusammen mit diesen Proteinen schließlich den "death inducing signaling complex" (DISC) (KISCHKEL et al., 1995; HAYASHI und MITA, 1999). Im Anschluss hieran werden unter anderem das "Interleukin 1 β converting-enzyme" (ICE/Kaspase-1) selbst oder die Kaspase-3 aktiviert (NAGATA und GOLSTEIN, 1995; ENARI et al., 1995; MUZIO et al., 1996).

Fas bewirkt zudem eine Apoptoseinduktion durch eine Kaspase-vermittelte Spaltung des "nuclear factor- κ B" (NF- κ B), welcher die Bildung von Proteinen induziert, die teilweise das Überleben der Zelle gewährleisten (RAVI et al., 1998).

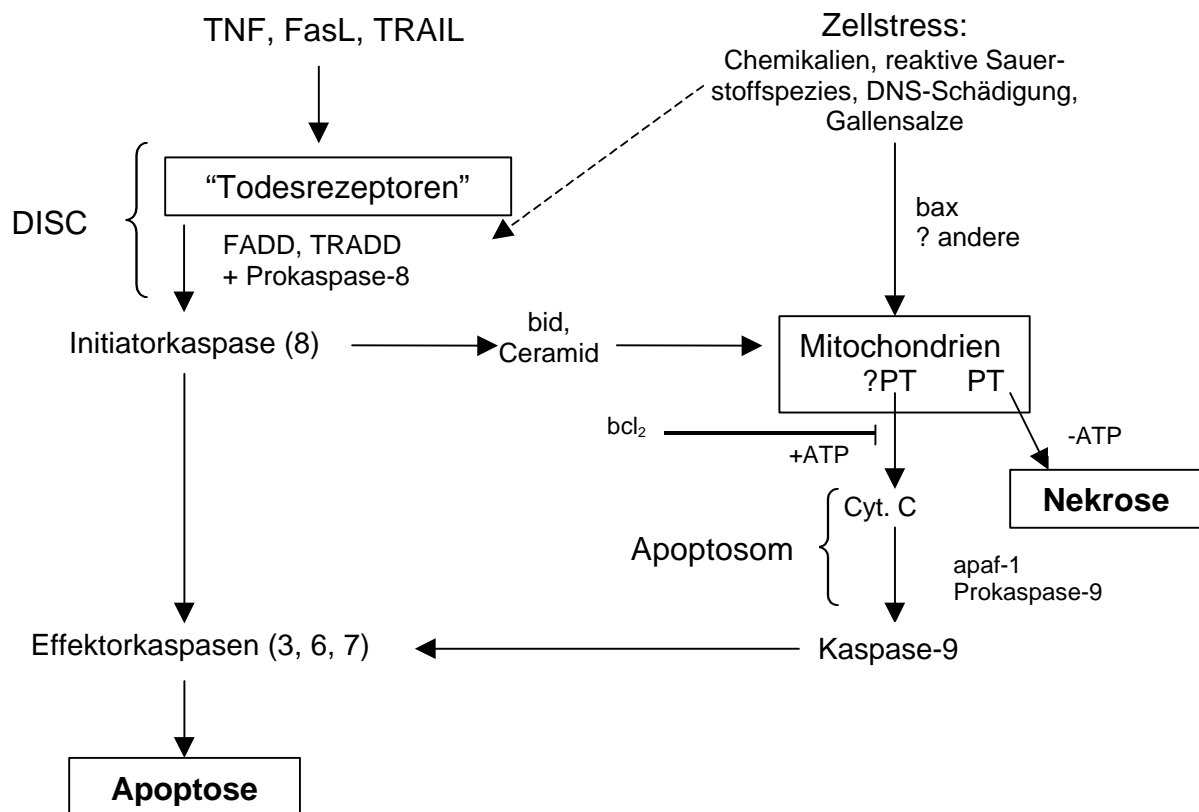


Abb. 1: Reaktionskaskade der Apoptose (MUZIO et al., 1996; NAGATA, 1997; HAYASHI und MITA, 1999; THOMSON und ARTHUR, 1999; KAPLOWITZ, 2000; PINKOSKI, 2000)

Dieses vereinfachte Schema stellt die Zellschädigung nach Aktivierung von "Todesrezeptoren" derjenigen durch intrazelluläre Schädigung gegenüber, wobei Mitochondrien bei beiden Kaskaden eine Rolle spielen. Die Apoptose stellt sich abhängig von der Aktion bzw. Konzentration der Initiator- und Effektor-kaspasen und ATP dar, wobei das Apoptosom beteiligt ist. Der nekrotische Zelltod ist dagegen von umfangreichen Veränderungen der Mitochondrien und einem Verlust von ATP begleitet. Die Effektor-kaspasen-3, -6 und -7 wirken auf zelluläre Substrate ein.

TNF – Tumor Nekrose Faktor; FasL – Fas-Ligand; DISC - "death-inducing signaling complex"; TRAIL – "TNF-related apoptosis-inducing ligand"; DD - "death domain"; FADD - "Fas-associated protein with DD"; TRADD - TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit DD; PT - "permeability transition" (Permeabilitätsänderung); RIP - "receptor interacting protein"; bcl₂ - B-Zell-Leukämie/Lymphom-2; ATP – Adenosin-Triphosphat; Cyt. C – Cytochrom C; apaf-1 – "apoptotic protease activating factor 1"

Der mit dem Alter korrelierte Anstieg der apoptotischen Hepatozyten bei F344-Ratten (HIGAMI et al., 1996; 1997a) sowie bei B6C3F1-Mäusen (MUSKHELISHVILI et al., 1995) steht mit einer gesteigerten Anzahl Fas-positiver Hepatozyten im Zusammenhang (HIGAMI et al., 1997b). Die vor allem perivenöse Lokalisation dieser markierten Zellen steht in Übereinklang mit der physiologischen Migration der Leberzellen vom periportal zum perivenösen Leberazinus (ZAJICEK et al., 1985; HIGAMI et al., 1997b). HIGAKI et al. (1996) wiesen bei menschlichen Leberzellen einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fas-Expression und der hepatozellulären Apoptoserate nach. Hierbei ist die Fas-Expression auf der Zelloberfläche

ausschlaggebend, da Zellen mit zytoplasmatischem Fas eine geringere Apoptose-rate aufweisen. In der unveränderten menschlichen Leber liegt eine 100%ige Fas-Expression vor, wohingegen Leberzellen in Gewebeproben von hepatozellulären Karzinomen nur zu 80% eine Fas-Expression aufweisen. In den Karzinomzellen ist Fas außerdem zu einem höheren Prozentsatz (70%) - im Vergleich zu 16% im unveränderten Lebergewebe - ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Hepatozelluläre Karzinome mit niedrigem Malignitätsgrad weisen mehr Zellen mit Fas auf der Zelloberfläche auf, als wenig differenzierte, invasiv wachsende und metastasierende Karzinome. Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen der Fas-induzierten Apoptose entkommen können (HIGAKI et al., 1996; NAGATA, 1997).

Weiterhin zeigen die Leberzellen in Arealen mit intensiver Infiltration mit CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten eine stärkere Fas-Expression, was vermutlich auf die Freisetzung von γ -Interferon durch aktivierte T-Lymphozyten mit nachfolgender Steigerung der Fas-Expression zurückzuführen ist (ITOH et al., 1991; HIGAKI et al., 1996).

2.2.1.2. Tumor Nekrose Faktor (TNF)

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) induziert ebenfalls durch Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor Apoptose. Der TNF-Rezeptor Typ 1 (TNF-R1), ein Mitglied der TNF-R-Familie, zeigt eine strukturelle Homologie zu Fas (CD95, APO-1), einem weiteren Mitglied dieser Familie (TRAUTH et al., 1989; YONEHARA et al., 1989), und hat mit diesem eine Zelluntergang-induzierende, intrazelluläre Region ("death domain", DD) gemein (ITOH und NAGATA, 1993; TARTAGLIA et al., 1993a; BOLDIN et al., 1995a). Auch der nächste Reaktionsschritt ähnelt dem der Fas/FasL-Reaktionskaskade. Die DD vom TNF-R1 bindet an die DD von zytoplasmatischen Proteinen, dem TNF-Rezeptor assoziierten Protein mit "death domain" (TRADD) (HSU et al., 1995) oder dem schon bei Fas (Kap. 2.2.1.1.) genannten "receptor interacting protein" RIP (STANGER et al., 1995). Die DD von FADD/MORT1 (siehe Fas), TRADD und RIP können miteinander interagieren, so dass an diesem Punkt eine funktionelle Kreuzung der Reaktionskaskaden vorliegt (VARFOLOMEEV et al., 1996). Der TNF-R1-TRADD-FADD/MORT1-Komplex löst im Anschluss eine Reaktionskaskade wie der Fas-FADD/MORT1-Komplex aus (BOLDIN et al., 1996; FRASER und EVAN, 1996; MUZIO et al., 1996). Im Gegensatz zu Fas kann der TNF-R über eine TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor-Domäne (TRAF-Domäne) den "nuclear factor- κ B" (NF- κ B) aktivieren (ROTHER et al., 1994; LIU et al., 1996; NAGATA, 1997). NF- κ B aktiviert nach Eindringen in den Zellkern Gene, die auch für Proteine kodieren, die Zellen vor der TNF-induzierten Schädigung schützen (BEG und BALTIMORE, 1996; LIU et al., 1996; VAN ANTWERP et al., 1996; WANG et al.,

1996). Weiterhin verursacht TNF- α die Hydrolyse von Sphingomyelin wobei Ceramid gebildet wird, welches die internukleosomale DNS-Fragmentierung induziert (KIM et al., 1991; OBEID, et al., 1993). Ein Anstieg der Ceramid-Konzentration in der Rattenleber wird u.a. bei der Hypoxie-induzierten Apoptose beobachtet (TURINSKY et al., 1991; OBEID, et al., 1993).

Hepatozyten weisen, wie viele andere Zelltypen auch, TNF-Rezeptoren auf (LIBERT et al., 1991) und können TNF synthetisieren (GONZÁLEZ-AMARO et al., 1994). Die Wirkung von TNF nach Bindung an den Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor Typ 1 (TNF-R1) wird widersprüchlich diskutiert. Einerseits wird von einer auch *in vivo* beobachteten hepatotoxischen Wirkung und DNS-Fragmentierung infolge Apoptose berichtet (TALMADGE et al., 1987; BOLLON et al., 1988; GREENBLATT und ELIAS, 1992; TARTAGLIA et al., 1993a, b; LEIST et al., 1995). Andererseits ließen sich Hepatozyten bei Perfusion der isolierten Leber mit TNF nicht schädigen (WANG und WENDEL, 1990) und in primären Zellkulturen traten TNF-induzierte zytotoxische Effekte erst nach Induktion eines Proteinsynthesearrests auf (ROFE et al., 1987; TSUTSUI et al., 1992; LEIST et al., 1994).

Die Sensitivität gegenüber der zytotoxischen TNF-Wirkung scheint nicht von der Anzahl der vorhandenen Rezeptoren (TSUJIMOTO et al., 1985), sondern vielmehr von anderen Zellcharakteristika abhängig zu sein (LEIST et al., 1994). Einen Hauptfaktor stellt die Balance zwischen schädlichen und protektiven Mechanismen dar, die beide von Zytokinen induziert werden. Die Induktion der Mangan-Superoxid-Dismutase (WONG et al., 1988) und der Hitzeschock-Proteine (JÄÄTTELÄ et al., 1992) zählen z.B. zu den Zell-schützenden Effekten, die durch die Einwirkung von TNF hervorgerufen werden. Daher führt die Blockierung der Synthese solcher Proteine (z.B. durch Actinomycin D, D-Galaktosamin) in vielen Zelltypen zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber TNF (PIERONI et al., 1970; GALANOS et al., 1979; LEIST et al., 1994). Unter derartigen Bedingungen traten sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen auf (LASTER et al., 1988; WOODS und CHAPES, 1993). Dagegen verhindert eine komplette Proteinsynthesehemmung die apoptotische Aktivität von TNF, da hierbei auch die Neusynthese von TNF selbst blockiert wird (LEIST et al., 1994; 1997).

Die Potenzierung der TNF-Wirkung durch Hemmung der Proteinsynthese spielt auch bei den Abwehrmechanismen gegenüber mikrobiellen Infektionen des Wirtes eine Rolle (KLIMPEL et al., 1990). Es ist bekannt, dass Virusinfektionen die TNF-Bildung induzieren, die Transkription von Zellproteinen hemmen und auch Zellen für die TNF-induzierte Apoptose anfällig machen können (HUANG und WAGNER, 1965; OHNO et al., 1993). Ebenso induzieren zahlreiche Entero- und Endotoxine die Freisetzung von TNF (MIETHKE et al., 1992; NAGAKI et al., 1994; LEIST et al., 1995).

2.2.1.3. “TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL/APO-2)

Auch der “TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL/APO-2) ist wie der Fas-Ligand (FasL) und TNF ein Mitglied der TNF-Familie und kann den apoptotischen Zelltod auslösen (WILEY et al., 1995; PITTI et al., 1996; GRIFFITH und LYNCH, 1998). Wie bei TNF wird dieser Effekt durch die Interaktion mit zwei Rezeptoren (R), TRAIL-R1 und TRAIL-R2, vermittelt (GRIFFITH et al., 1998). TRAIL scheint hierbei insbesondere in Kulturen maligner Zellen, nicht aber in normalem Gewebe, eine Rolle zu spielen (GRIFFITH et al., 1998; RIEGER et al., 1998; THOMAS und HERSEY, 1998; PHILLIPS et al., 1999; ZHANG et al., 1999). Es wird angenommen, dass unveränderte Zellen durch die Expression von TRAIL-R3 und TRAIL-R4, denen die zytoplasmatischen DDs fehlen, von der TRAIL-induzierten Apoptose geschützt sind, indem TRAIL nicht an diese Rezeptoren binden kann oder nach der Bindung antiapoptotische Signale ausgelöst werden (GURA, 1997; GRIFFITH und LYNCH, 1998). Die in den nachfolgenden Schritten aktivierten Kaspasen scheinen denen der Aktivierung durch den FasL zu entsprechen (MARSTERS et al., 1996; GRIFFITH und LYNCH, 1998; GRIFFITH et al., 1998), wobei nur bei der Aktivierung der Kaskade durch TRAIL, nicht aber nach Bindung von FasL oder TNF- α an ihre Rezeptoren eine Gruppierung der Mitochondrien um den Zellkern beobachtet wurde (THOMAS et al., 2000). Hieraus folgen hohe Kaspase-Konzentrationen direkt um den Zellkern, was die Apoptoseinduktion zu fördern scheint (THOMAS et al., 2000).

2.2.2. Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von den Mitochondrien

Der zweite Hauptreaktionsweg der Apoptoseinduktion wird durch Veränderungen im Mitochondrien-Membranpotential ausgelöst (KROEMER et al., 1997; RAFF, 1998). Eine Mitochondrien-Membranpotentialänderung führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C, Prokaspase-9 und -2 sowie dem Apoptose induzierenden Faktor (AIF) aus dem Raum zwischen den beiden Mitochondrienmembranen (EARNSHAW, 1999; SUSIN et al., 1999). Cytochrom C bindet an den “apoptotic protease activating factor 1” (apaf-1), dieser aktiviert die Prokaspase-9 und -2, was wiederum zu einer Aktivierung der Kaspasen-3, -6 und -7 und somit zur Apoptose führt (SUN et al., 1999; SUSIN et al., 1999). Der Komplex Cytochrom C, apaf-1 und die Prokaspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet (KAPLOWITZ, 2000) (siehe Abb. 1).

Eine absolute Trennung dieser Kaskade vom Rezeptor-Ligand-Bindungsweg ist nicht möglich, da auch nach Interaktion von FasL/Fas eine Veränderung des Mitochondrien-Membranpotentials nach Aktivierung zytoplasmatischer Faktoren durch die Kaspase-8 (FLICE) beobachtet wird. Kaspase-8-Produkte sind z.B. der “caspase-activated factor” (CAF) (STEEMANS et al., 1998) oder bid, ein proapoptotisches Mit-

glied der bcl_2 -Familie (siehe Kap. 2.2.5.) (STEEMANS et al., 1998; GROSS et al., 1999b; SUN et al., 1999; YAMADA et al., 1999). Zudem können beide Reaktionswege durch die gesteigerte Expression von bcl_2 unterdrückt werden (SCAFFIDI et al., 1998; CORY et al., 1999). bcl_2 unterbindet Veränderungen im Mitochondrien-Membranpotential sowie eine Freisetzung von Cytochrom C (GROSS et al., 1999b; SHIMIZU et al., 1999), wohingegen in Hepatozyten die Freisetzung von Cytochrom C induziert (GROSS et al., 1999b).

2.2.3. Aktivierung von Enzymen der Fas/FasL-Kaskade unabhängig von Rezeptoren

Zytotoxische T-Lymphozyten können auch durch Sekretion von Granzym B in Kombination mit Perforin, ein in der Zellmembran der Zielzelle Poren-induzierendes Protein, eine Apoptose durch Aktivierung zahlreicher Zystein-Proteasen wie FLICE (Kaspase 8) auslösen (BERKE, 1995; DARMON et al., 1995). Diese Induktion der Reaktionskaskade der Apoptose - über Aktivierung der Kaspase-3 (DARMON et al., 1995) - unterscheidet sich von dem Kalzium-unabhängigen Fas/FasL-Weg durch seine Kalziumabhängigkeit (ROUVIER et al., 1993; VIGNAUX und GOLSTEIN, 1994).

2.2.4. DNS-Fragmentierung

Einige der auffälligsten Veränderungen bei der Apoptose von Zellen finden sich im Kern (KERR et al., 1972; WYLLIE, 1987) und sind mit der internukleosomalen Fragmentierung der nukleären DNS vergesellschaftet (WYLLIE, 1980). Bei der Apoptose kommt es zur Degradierung des Chromatins in mono- und oligonukleosomale Fragmente (ARENDS et al., 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Es handelt sich um DNS-Fragmente mit einer Länge von typischerweise 180-200 Basenpaaren (bp) bzw. deren Multimeren (ARENDS et al., 1990; ALISON und SARRAF, 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996a oder b). Dennoch sind DNS-Fragmente dieser Länge kein Kardinalmerkmal. Wird die Apoptose in kultivierten Leberzellen durch Serumentzug oder TGF- β_1 induziert, präsentieren die Zellen zum Teil vorübergehend größere Abschnitte (50-300 kbp). Desweiteren konnte auch das Ausbleiben jeglicher DNS-Fragmentierung beobachtet werden (COLLINS et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1993; ORMEROD et al., 1994; DOUGLAS et al., 1995; COLLINS et al., 1997) bzw. auch in nekrotischen Zellen eine DNS-Fragmentierung nachgewiesen werden (ALISON und SARRAF, 1995; GRASL-KRAUPP et al., 1995).

Die DNS-Degradierung erfolgt durch die Aktivierung einer nicht-lysosomalen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonuklease, wobei Veränderungen im Ionenmilieu des Kernes ausreichend sind, um dieses Enzym zu aktivieren (ISHIDA et al., 1974; COHEN und DUKE, 1984; ALLBRITTON et al., 1988; McCONKEY et al., 1989a; ARENDS et al., 1990; ALISON und SARRAF, 1995). Zudem sind DNS-Fragmentierung und Zelltod von einer anhaltenden Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels abhängig (ORRENIUS et al., 1992). Werden die mRNS- und die Proteinsynthese in der Zelle gehemmt, ist eine Blockierung der Endonuklease-Aktivität die Folge (McCONKEY et al., 1989a; 1990), was auf eine Neusynthese des Enzyms hindeutet (ALISON und SARRAF, 1995). Derart charakterisierte Endonukleasen können in Kernen vieler Zelltypen nachgewiesen werden (ISHIDA et al., 1974; LIU et al., 1980; NAKAMURA et al., 1981). Eine Proteinsynthese spielt aber auch bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose von Thymozyten eine Rolle, bei welcher nach Interaktion mit dem Plasmamembranrezeptor ein Protein gebildet wird, dass als Kalziumkanal dient (McCONKEY et al., 1989b). Bei der Fragmentierung erfolgt keine Deproteinisierung der DNS, so dass die Hauptproteine, die aus dem Kern extrahiert werden können, mit denen unveränderter Zellen übereinstimmen. Hierzu zählen die vier zentralen Histone, H2A, H2B, H3 und H4, um die sich die DNS schlingt sowie das ans Zwischenstück assoziierte H1 (ARENDS et al., 1990). Die endogen gespaltene DNS besteht aus Doppelstrang-Molekülen (ARENDS et al., 1990). Die DNS-Fragmente in apoptotischen Zellen können in zwei Klassen unterteilt werden: die frei dissoziierten sowie die weiterhin an den Kern gebundenen Oligonukleosomen (ARENDS et al., 1990). Die freien DNS-Fragmente setzen sich hauptsächlich aus kleineren Oligonukleosomen, einschließlich Mononukleosomen, zusammen. Beide Klassen zeigen nach elektrophoretischer Aufspaltung die für die Apoptose typische "DNS-Leiter" (siehe auch Kap. 2.7.4.1.) (ARENDS et al., 1990).

Die Endonuklease scheint zu gewährleisten, dass kleine Kernfragmente gebildet werden, die leicht durch phagozytierende Zellen aufgenommen werden (ARENDS et al., 1990). Außerdem führt die Spaltung in Doppelstrangfragmente zu einem Verlust der Transkriptionsaktivität (HARLAND et al., 1983), was den Transfer von aktiven Genen einer sterbenden Zelle in den Kern von phagozytierenden Zellen verhindern könnte (ARENDS et al., 1990).

2.2.5. Die B-Zell-Leukämie/Lymphom-2-Gen (bcl_2)-Familie

Die Mitglieder der B-Zell-Leukämie/Lymphom-2 (bcl_2)-Gen-Familie spielen bei der Regulation der Apoptose eine zentrale Rolle.

Zur bcl_2 -Gen-Familie gehören Antagonisten der Apoptose wie bcl_2 , $bcl-x_L$, $mcl-1$ und $A1$ (VAUX et al., 1988; BOISE et al., 1993; KOZOPAS et al., 1993; LIN et al., 1993; REED, 1994; ADAMS und CORY, 1998; GROSS et al., 1999a) und Agonisten der Apoptose wie $bcl-x_S$, bax , bak , bad und bid (OLTVAI et al., 1993; CHITTENDEN et al., 1995; YANG et al., 1995; ADAMS und CORY, 1998; GROSS et al., 1999a; YIN, 2000) (Tabelle 2). Eine Sonderform stellt das Protein $bcl-x$ dar, da durch Spaltung sowohl ein Antagonist der Apoptose, das $bcl-x_L$ (L steht für long) als auch ein Agonist, das $bcl-x_S$ -Protein (S steht für short), entstehen kann (CLEARY et al., 1986).

Tab. 2: Die Proteine der bcl_2 -Familie (modifiziert nach YIN, 2000)

Funktion	Organismus	Mitglieder der bcl_2 -Familie	BH-Domänen
antiapoptotisch	Vertebraten	bcl_2 , $bcl-x_L$, $bcl-w$, $mcl-1$, $A1/Bfl-1$, NR-13	BH1, BH2, BH3, BH4
	<i>C. elegans</i>	$ced-9$	BH1, BH2, BH3, BH4
proapoptotisch	Vertebraten	bax , bak , bok/mtd , $bcl-x_S$	BH1, BH2, BH3
		bad , bid , bik/nbk , blk , hrk , bim/bod , $nip3/bnip3$, $nix/bnip3L$	BH3
	<i>C. elegans</i>	$EGL-1$	BH3

Vertebraten, in denen die Proteine der bcl_2 -Familie bestimmt wurden, schließen Mensch, Maus, Ratte und Huhn ein.

BH1-4 – bcl_2 -Homologiedomänen 1-4

Allen Mitgliedern der bcl_2 -Familie gemein ist die strukturelle Homologie bestimmter Domänen, den “ bcl_2 -Homologiedomänen” (BH1 bis BH4) (siehe Tab. 2). Die Regionen BH1 und BH2 der Antagonisten, die den Zelltod unterdrücken, sind für die Heterodimer-Bildung mit den Apoptose-Agonisten verantwortlich (YIN et al., 1994; 2000). Bei den Agonisten erfolgt die Heterodimer-Bildung mittels der BH3-Domäne (ADAMS und CORY, 1998; GROSS et al., 1999a).

Das Mengenverhältnis von Antagonist zu Agonist und/oder die Bindungsfähigkeit in Abhängigkeit von der Molekülstruktur entscheiden letztendlich, ob eine Zelle den apoptotischen Signalen folgt oder nicht (OLTVAI et al., 1993; OLTVAI und KORSMEYER, 1994; HALDAR et al., 1996). Die Regulierung erfolgt in erster Linie über eine Wirkung auf die Mitochondrien. bcl_2 -, $bcl-x_L$ -, bax - oder bid -Proteine regulieren die Aktivierung von Kaspasen über die Freisetzung von Cytochrom C. Apoptose-Antagonisten (bcl_2 , $bcl-x_L$) hemmen die Cytochrom C-Freisetzung, Agonisten (bax , bid) fördern sie (MANON et al., 1997; GREEN und REED, 1998; GROSS et al., 1999a, b). Hierbei agieren sie möglicherweise als Membrankanäle in den Mitochondrien (ANTONSSON et al., 1997; SCHLESINGER et al., 1997; YIN, 2000) und ha-

ben somit unterschiedliche Wirkungen auf die Leitfähigkeit und die Ionen-Selektivität (ADAMS und CORY, 1998; GREEN und REED, 1998; GROSS et al., 1999a).

Das zuerst entdeckte membranständige bcl_2 -Protein ist mit Hilfe hydrophober Aminosäuren in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und des Zellkerns verankert. Dies sind die Hauptbildungsorte freier Radikale in der Zelle. bcl_2 wird eine antioxidative Wirkung und die Rolle eines Fängers freier Radikale zugeschrieben, da es Zellen bis zu einer bestimmten Dosis vor der letalen Wirkung von H_2O_2 schützen kann. Neben der Apoptose-Hemmung ist es auch in der Lage, den nekrotischen Zelltod zu verhindern (STRASSER et al., 1991). bcl_2 soll eine Stabilisierung von Mikrotubuli bewirken (HOCKENBERY et al., 1990; STRASSER et al., 1991; MONAGHAN et al., 1992; ROWINSKY et al., 1992; HOCKENBERY et al., 1993; REED, 1994; HALDAR et al., 1995; 1996; 1997). Zusätzlich wird beschrieben, dass bcl_2 die intrazelluläre Homöostase der Kalziumionen (Ca^{2+}) beeinflussen kann, indem es die Akkumulation von Ca^{2+} in den Mitochondrien verhindert (BAFFY et al., 1993).

Das bcl_2 -Protein ist in langlebigen, sich selbst erneuernden Stammzellpopulationen, wie z.B. in Epithelien von Haut, Kolon und Prostata, nachweisbar (HOCKENBERY et al., 1991; LU et al., 1993b).

In der normalen menschlichen Leber gelang der Nachweis von bcl_2 -Protein in epithelialen Zellen, welche die Gallenductuli sowie die kleinen interlobulären Gallengänge auskleiden. Epithelien größerer Gallengänge oder Hepatozyten sind dagegen bcl_2 -negativ (CHARLOTTE et al., 1994). In einem Großteil der Cholangiokarzinome sind, wie in anderen malignen Tumoren (GAULARD et al., 1992; LU et al., 1993a; McDONNELL et al., 1992), viele Tumorzellen bcl_2 -positiv. Ebenso enthalten Zellen in Lebermetastasen von Adenokarzinomen der Mamma und teilweise auch des Kolons bcl_2 . Karzinome hepatozellulären Ursprungs und Lebermetastasen von Ovarialtumoren sind dagegen bcl_2 -negativ. Die in nodulären Hyperplasien der Leber nachweisbaren bcl_2 -positiven Zellen sind dem Gallengangsepithel zuzuordnen (CHARLOTTE et al., 1994). In Diethylnitrosamin-induzierten basophilen Lebertumoren fanden sich jedoch bcl_2 -positive Leberzellen (LEE, 1997). Wurde durch die anschließende Applikation von Phenobarbital das Wachstum eosinophiler Lebertumoren induziert, waren diese allerdings bcl_2 -negativ (LEE, 1997). Das Überleben der Leberzellen über die lange Zeitspanne von 200 bis 400 Tagen (McDONALD, 1961) scheint ebenso wie bei den ähnlich lange lebenden quer gestreiften, ebenfalls bcl_2 -negativen Muskelfasern (HOCKENBERY et al., 1991), meist unabhängig von bcl_2 reguliert zu werden (CHARLOTTE et al., 1994).

Im Gegensatz zu bcl_2 wird bax , der Gegenspieler von bcl_2 (OLTVAI et al., 1993), in der Leber stark exprimiert (HOCKENBERY et al., 1991; LU et al., 1993b; KRAJEWSKI et al., 1994; PENAULT-LLORCA et al., 1998). bax kann dementspre-

chend neben der Hemmung von bcl_2 entweder auch selbst eine aktive Funktion in der Apoptoseinduktion besitzen, oder zumindest in der Leber mit anderen Mitgliedern der bcl_2 -Familie als Gegenspieler interagieren (KRAJEWSKI et al., 1994). Versuche an Mäusen mit partieller Hepatektomie zeigten, dass $bcl-x$ statt bcl_2 eine physiologische Rolle während des Wachstums und der Proliferation haben könnte (TZUNG et al., 1997).

Wird die Apoptose in der Leber durch den Fas-Reaktionsweg induziert, scheint bcl_2 ein weiteres proapoptotisches Mitglied der bcl_2 -Familie, für die Induktion der Cytochrom C-Freisetzung und der Kaspase-Aktivierung verantwortlich zu sein (YIN, 2000). Mit denselben Folgen aktiviert TNF über die Kaspase-8 (FLICE) bcl_2 in Zellkulturen (GROSS et al., 1999b). Die Proteine bcl_2 und $bcl-x_L$ hemmen dagegen die Fas-induzierte Apoptose (NAGATA, 1997).

2.2.6. Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1)

Der Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) gehört zu einer Proteinfamilie, die an der Differenzierung und Rückbildung vieler Organe beteiligt ist (MASSAGUÉ, 1987; RIZZINO et al., 1988; ROBERTS et al., 1988; BOIVIN et al., 1995).

TGF- β_1 wird in epitheliale Gewebe eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation, in mesenchymalem Gewebe jedoch eine stimulierende Wirkung zugeschrieben (MICHALOPOULOS, 1990; BURSCH et al., 1993; PETERSEN et al., 1994). In der Leber wurde eine DNS-Synthese-Hemmung durch TGF- β_1 beobachtet (CARR et al., 1986; STRAIN et al., 1987; RUSSELL et al., 1988). TGF- β_1 agiert hierbei auf mehreren Ebenen als Hemmfaktor der Zellteilung (ITO et al., 1990; LAIHO et al., 1990; PIETENPOL et al., 1990a, b; MÜNGER et al., 1992; EWEN et al., 1993; GENG und WEINBERG, 1993; ALEXANDROW und MOSES, 1995). Um das Leberzellwachstum beeinflussen zu können, muss TGF- β_1 präsent sein, bevor die Zelle in die DNS-Synthese-Phase eintritt (NAKAMURA et al., 1985; CARR et al., 1986; STRAIN et al., 1987; ALEXANDROW und MOSES, 1995). TGF- β_1 induziert eine Zelleliminierung mit Hilfe der Apoptose als Gegenregulation bei Leberhyperplasie, wie sie durch Mitogen-Applikation (z.B. Cyproteronacetat (CPA); siehe auch Kap. 2.4.2.) induziert werden kann (SCHULTE-HERMANN et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986). Der Transforming growth factor β_1 scheint vor allem die Apoptose perivenös gelegener Hepatozyten in Rattenlebern zu fördern (TERRELL et al., 1993). Bei längerer *in vitro* Inkubation von kultivierten perivenösen Leberzellen mit TGF- β_1 wird jedoch, wie bei höherer Dosierung verschiedener Chemikalien (siehe Kap. 2.4.4.) (KERR, 1969; REYNOLDS et al., 1984; PRITCHARD und BUTLER, 1989; LEDDACCOLUMBANO et al., 1991; 1992), ein vermehrtes Auftreten von Nekrosen beobachtet (OHNO et al., 1995). TGF- β_1 wird von nicht-hepatozellulären, epithelialen

Zellen (CARR et al., 1989; NAGY et al., 1989; ROTELLO et al., 1991), vermutlich aber auch von Hepatozyten (BURSCH et al., 1993), als ein inaktiver Komplex, bestehend aus TGF- β_1 und TGF- β -“latent associated protein” (TGF- β -LAP), sezerniert. Der TGF- β_1 /TGF- β -LAP-Komplex bindet zunächst an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor der Leberzellmembran und wird entweder direkt in die Zelle transferiert und abgebaut, oder durch Proteolyse außerhalb der Zelle aktiviert. Anschließend bindet das aktivierte TGF- β_1 an seinen eigenen Rezeptor und bewirkt einen Proliferationsarrest und eine Stimulation der Apoptose (JIRTLE et al., 1991; BURSCH et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1992a, b; BURSCH et al., 1993; GOLDSWORTHY et al., 1996b). Nach partieller Hepatektomie ist TGF- β_1 auch für die frühe Proliferationshemmung verantwortlich (STRAIN et al., 1987; RUSSELL et al., 1988; JAKOWLEW et al., 1991); dieser Effekt wird jedoch durch die schnelle Metabolisierung von TGF- β_1 in der Leber sowie die abnehmende Bindungsfähigkeit an seinen Rezeptor nach etwa 24 Stunden aufgehoben (CARR et al., 1986; RUSSELL et al., 1988; WAKEFIELD et al., 1990; MILLS et al., 1995).

2.2.7. Das p53-Gen und -Protein

Das p53-Gen gehört zu den Tumorsuppressorgenen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und ihre Zielprodukte auf der RNS-Ebene regulieren (KNUDSON, 1993). Das p53 Protein kann in drei Abschnitte mit spezifischen Funktionen unterteilt werden: 1. der Abschnitt mit transkriptionsaktivierender Eigenschaft, 2. der DNS-bindende Abschnitt und 3. der Abschnitt, der den DNS-bindenden Abschnitt stabilisiert (CHO et al., 1994; PRIVES, 1994). Treten DNS-Defekte in einer Zelle auf (z.B. durch Strahlung), wird p53 (auch “guardian of the genom” genannt) aktiviert (KASTAN et al., 1991; LANE, 1992) (siehe Abb. 2). Dies führt zu einer Erhöhung des p21-“wildtyp-activated-fragment”/“CdK-interacting protein” (WAF/CIP)-Levels. Das Protein p21 blockiert die Aktivität einiger Cyclin-abhängiger Kinasen (CdK) und/oder bildet einen Komplex mit dem “Proliferating cell nuclear antigen” (PCNA) (EL-DEIRY et al., 1993; HUNTER, 1993; XIONG et al., 1993).

Die CdKs führen zu einer Phosphorylierung des Retinoblastomgens (Rb), wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. E2F reguliert nun seinerseits die Expression der für die DNS-Synthese notwendigen Gene. Werden die CdKs indirekt durch p53 gehemmt, wird diese Reaktionskaskade und somit der Eintritt in die S-Phase der Zelle verhindert. Die Folge ist ein Wachstumsstillstand in der G1/GO-Phase. Das “growth arrest DNA damage inducible gene” (GADD45)-Protein, ebenfalls durch p53 induziert, ist offensichtlich an der nun möglichen DNS-Reparatur beteiligt (KASTAN et al., 1991). Kann der DNS-Schaden in der Zelle nicht behoben werden, wird durch einen p53-induzierten Anstieg des bax-Protein-Spiegels und

dessen Bindung an bcl_2 der programmierte Zelltod eingeleitet (SATO et al., 1994; YIN et al., 1994; MIYASHITA und REED, 1995).

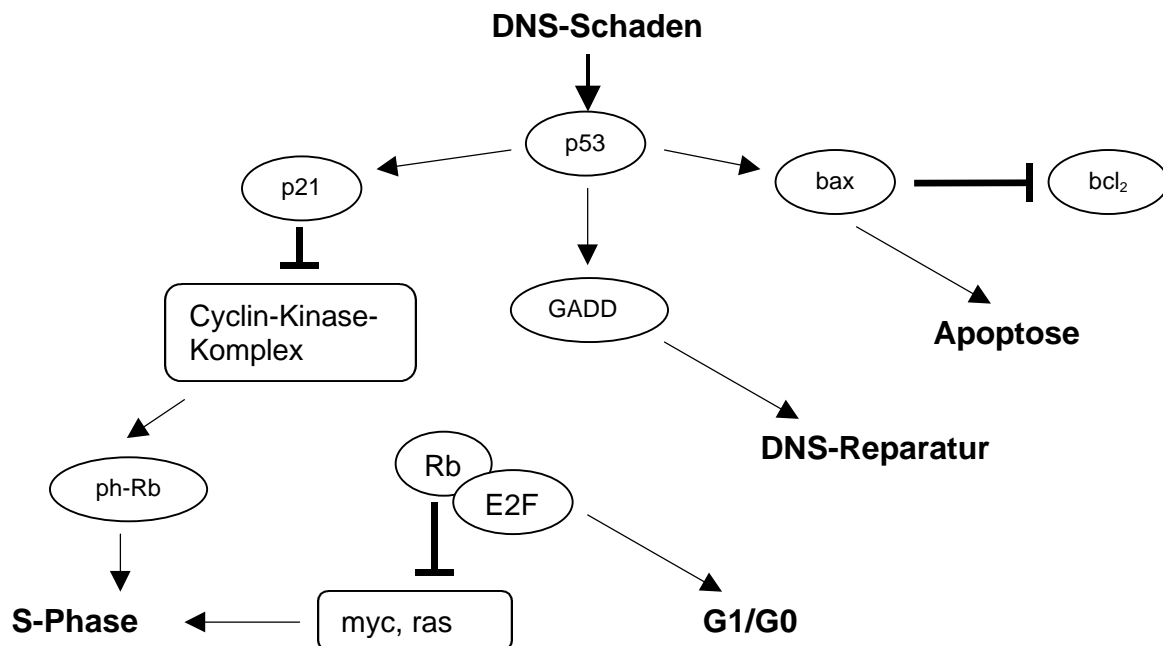


Abb. 2: Molekulare Mechanismen der Genaktivierungskaskade durch p53 nach DNS-Schädigung (POREMBA et al., 1996)

Rb – Retinoblastomprotein; ph-Rb – phosphoryliertes Rb; GADD – "growth arrest DNA damage inducible gene"; E2F – Transkriptionsfaktor; bcl_2 – B-Zell-Leukämie/Lymphom-2

Das p53-Protein hat folglich zwei Funktionen: a) Induktion des Wachstumsstillstands, um DNS-Schäden reparieren zu können und b) die Einleitung der Apoptose. Weiterhin wird von einer Aktivierung der Fas-Synthese durch p53 berichtet (OWEN-SCHAUB et al., 1995). Diese Aktivierung ist insofern von Interesse, als bei der durch Strahlung induzierten Apoptose, wie auch in der Reaktionskaskade von Fas-FasL, eine Aktivierung der Kaspase-3 erfolgt (NAGATA und GOLSTEIN, 1995; MUZIO et al., 1996), die jedoch p53- und nicht Fas-FasL-abhängig ist (FUCHS et al., 1997). Da die Kaspase-3 auch durch Granzym B der zytotoxischen T-Zellen (siehe Kapitel 2.2.3.) aktiviert wird (DARMON et al., 1995), zeigt sich eine Einbeziehung dieses Enzyms in mehrere Reaktionskaskaden.

Der Nachweis des p53-Proteins in Geweben ist aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (5 bis maximal 45 Minuten) sowie der geringen gebildeten Mengen schwierig (LANE und BENCHIMOL, 1990; SHAULSKY et al., 1990). In Kontrolllebern von Mäusen und Ratten konnte p53 nicht nachgewiesen werden (MacCALLUM et al., 1996; VAN GIJSSEL et al., 1998). Hohe Wildtyp p53 Proteinspiegel wurden dagegen nach der genotoxischen Schädigung bei Verabreichung einer Reihe von Hepatokarzinogenen nachgewiesen (VAN GIJSSEL et al., 1997; 1998). Nach der Verabrei-

chung von N-Hydroxy-2-Acetyl-amino-Fluoren (N-OH-AAF) an männliche Wistar-Ratten zeigte sich die stärkste Konzentration von p53 in der periportalen Zone im Leberazinus, die Zone, in der N-OH-AAF die stärkste zytotoxische Wirkung erzielt. Nekrotische Zellen wurden nicht markiert, da diese Zellen nicht zur Proteinsynthese befähigt sind (VAN GIJSEL et al., 1998).

Besondere Aufmerksamkeit erlangte p53, da in etwa 50% aller malignen humanen Tumoren molekulare Veränderungen im p53-Gen mit nachfolgender Funktionseinschränkung oder Funktionsverlust nachweisbar sind (LEVINE et al., 1994). Es konnte z.B. eine Korrelation zwischen dem Auftreten von p53-Mutationen und regional gehäuft auftretenden humanen hepatozellulären Karzinomen, chronischen Hepatitis-B-Infektionen sowie der Belastung der Nahrungsmittel mit Aflatoxin B1 aufgezeigt werden (BRESSAC et al., 1991; HSU et al., 1991). Auch hepatozelluläre Karzinome, die bei männlichen Fischer 344 Ratten durch eine Cholin-Mangeldiät induziert wurden, weisen eine hohe Frequenz an p53-Mutationen auf (SMITH et al., 1993).

Neben dem p53-Anstieg nach DNS-Schädigung kann auch nach einer Anzahl nicht-genotoxischer Insulte, wie Hitzeschock und Hypoxie, eine Zunahme der p53-Aktivität beobachtet werden (GRAEBER et al., 1994; 1996). Die p53-Aktivierung ist von einem Anstieg der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begleitet. Eine Entfernung der Sauerstoffradikale, z.B. durch Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), ein in der Mitochondrienmatrix lokalisiertes Enzym (FRIDOVICH, 1995; PANI, 2000), verhindert die p53-induzierte Apoptose (JOHNSON et al., 1996; POLYAK et al., 1997). PANI et al. (2000) wiesen eine gesteigerte MnSOD-Synthese in p53-defizienten Mäusefibroblasten nach, was darauf hindeutet, dass eine negative Regulation von MnSOD durch das Tumorsuppressorgen p53 auf der Ebene der Proteinsynthese erfolgt.

2.3. Nomenklatur der Apoptose

Vor Etablierung des Begriffes "Apoptose" etwa im Jahr 1980 wurde der Prozess der Apoptose und die resultierenden apoptotischen Körperchen mit einer Vielzahl von Synonyma benannt (WYLLIE et al., 1980).

Im Folgenden seien einige der Bezeichnungen erwähnt, deren Verwendung teilweise sehr kritisch gesehen wird (BURSCH et al., 1992):

Tab. 3: Auflistung der in der Literatur veröffentlichten Synonyma der Apoptose (WYLLIE et al., 1980)

Synonym und seine Bedeutung	Zitate
Unterteilung in Subkategorien: "Physiologischer Zelltod" Vor über 100 Jahren erste Dokumentation des Zelltodes bei multizellulären Organismen unter physiologischen Konditionen "Toxischer Zelltod" "Kompensatorischer Zelltod"	VOGT, 1842; LEVIN, 1995
"Necrobiosis" Genereller Name für den physiologischen Zelltod (u.a. Zerstörung alternder Erythrozyten, Abstoßung der Keratinschuppen der Haut) zur Abgrenzung von der pathologischen "Necrosis"	VIRCHOW, 1871; WALTER und ISRAEL, 1974 (zitiert nach WYLLIE et al., 1980)
"Zeiosis" (zéiô, griech. - ich koche) Ursprünglich geprägt für eine brodelnd erscheinende Zelloberfläche (Plasmamembranausstülpung mit Zellorganellen – Budding) kultivierter Neuronen, Tod beim zellvermittelten Immunangriff	COSTERO und POMERAT, 1951
"shrinkage necrosis"	KERR, 1965; 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980
"Necrosis" Widersprüchlicher Name für die Apoptose im sich normal entwickelnden Embryo	SAUNDERS, 1966; SCHWEICHEL und MERKER, 1973
"active", "suicidal" cell death	WYLLIE et al., 1980
"single cell necrosis"; Einzelzellnekrose	VIRCHOW, 1871, (zitiert nach WYLLIE et al., 1980)
"popcorn-type cytolysis" Verursacht durch sensibilisierte T-Lymphozyten	RUSSELL et al., 1972
"Extrusion subdivision with the production of minisegregants" JOHNSON bestätigt 1978 die Übereinstimmung mit der Apoptose	JOHNSON et al., 1975; 1978
"Programmed cell death"	HOCKENBERY, 1995; LEVIN, 1995

Die Unterteilung in "physiologische", "toxische" und "kompensatorische" Apoptose soll wegen der zunehmenden Bedeutung näher erläutert werden. Da der apoptotische Zelltod nicht nur unter physiologischen Bedingungen zu beobachten ist, hielt LEVIN (1995) es für sinnvoll, eine Unterteilung in Situations-bedingte Subkategorien vorzunehmen. Zum einen die "physiologische Apoptose" als Überbegriff für das Auftreten im sich normal entwickelnden sowie im adulten Organismus. Desweiteren die

“toxische Apoptose”, die durch einen pathologischen Stimulus (Mikroorganismus, Xenobiotika, Hypoxie etc.) induziert werden kann sowie schließlich die “kompensatorische Apoptose” als Begleiterscheinung eines abnorm erhöhten Zellturnover. Letztere tritt in hyperplastischen oder in neoplastischen Organen, bei der Organatrophie nach Reduktion der gewebespezifischen Stimulation (z.B. Prostata nach der Kastration, Leber nach Phenobarbital- oder Cyproteronacetat-Entzug) oder auch in Lymphfollikeln nach Antigen-Stimulation auf.

Die Unterteilung anhand der Ursache lässt erkennen, dass auch die Benutzung des Begriffs “Programmed cell death” (PCD) nicht immer korrekt ist. Unstimmigkeiten bei der Verwendung von “PCD” als Synonym für “Apoptose” ergeben sich unter anderem in folgenden Situationen (HOCKENBERY, 1995; LEVIN, 1995):

- a) Apoptosen in Zellkulturen haben wenig mit einem physiologischen PCD gemein,
- b) im Endometrium der Frau tritt Zyklus-abhängig eine Nekrose von Zellen auf programmierter Grundlage auf,
- c) nicht jeder Zelltod im Rahmen der normalen Entwicklung hat eine apoptotische Morphologie und
- d) durch ionisierende Strahlung, Viren oder Toxine verursachte Apoptose ist nicht primär endogen programmiert, sondern nützt nur sekundär das endogene Apoptoseprogramm.

Nicht nur für die Apoptose als Vorgang, sondern auch für ihre Produkte, die apoptotischen Körperchen, finden sich zahlreiche Synonyma in den Publikationen (Tab. 4):

Tab. 4: Auflistung der in der Literatur auftretenden Bezeichnungen für apoptotische Körperchen (WYLLIE et al., 1980; ALISON und SARRAF, 1995)

Synonym und Gewebelokalisation	Zitate
“Acidophilic” oder “Councilman bodies” (WILLIAM T. COUNCILMAN, Pathologe, Baltimore 1854-1933) in der Leber	KLION und SCHAFFNER, 1966; KERR, 1971; KERR et al., 1972; PSCHYREMBEL, 1991
“tingible bodies” Im lymphatischen Keimzentrum	SWARTZENDRUBER und CONGDON, 1963; KERR et al., 1972; SEARLE et al., 1975
“karyolytic bodies” In den Darmkrypten nach radioaktiver Be- strahlung	BRONSON, 1981
“sarcolytes” gestreifte Muskelfasern des sich zurückbilden- den Kaulquappenschwanzes	WEBER, 1969
“Civatte bodies”, “sunburn cells” oder “satellite cell dyskeratosis” in der Epidermis	WEEDON et al., 1979

2.4. Funktion und Vorkommen der Apoptose

Der aktive Zelltod, die Apoptose, ist ein phylogenetisch alter Prozess, der bei einer großen Vielfalt von Tieren (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1992) und Pflanzen (GREENBERG et al., 1994) beobachtet werden kann. Die biologische Relevanz wurde zunächst bei der embryonalen Entwicklung von Säugetieren erkannt (NUSSBAUM, 1901; GLÜCKSMANN, 1930; LOCKSHIN und WILLIAMS, 1965; SCHWEICHEL und MERKER, 1973). Diese Form des Zelltodes (zu jener Zeit noch als "necrosis" bezeichnet) hat eine Funktion bei der Entfernung überschüssigen Gewebes, wie z.B. den Gewebebrücken zwischen den Fingern, dem Müllerschen Gang bei männlichen Individuen und den überzähligen Neuronen. Bei der Metamorphose niederer Wirbeltiere und Wirbelloser, wie z.B. bei Insekten, tritt physiologischerweise eine massive Gewebeinvolution (z.B. Kaulquappenschwanz) und Zellelimination auf (SAUNDERS, 1966). Aber auch in adulten Organismen kann diese nicht exogen bedingte Form des Zelltodes beobachtet werden, wobei in normalen Geweben alte, überschüssige und präkanzeröse Zellen beseitigt werden (BURSCH et al., 1992). Dies geschieht z.B. bei der Involution des Uterus nach der Geburt und bei der Rückbildung hormonabhängiger Organe nach Entfernung des hormonproduzierenden Organs (SCHULTE-HERMANN et al., 1995b). Die Apoptose bestimmt somit zusammen mit der Mitose, ihrem Gegenspieler, die Erhaltung, das Wachstum und die Involution von Geweben (WEEDON et al., 1979; BURSCH et al., 1992).

2.4.1. Apoptose in der normalen Leber

Die Apoptose ist in der adulten, gesunden Leber ein seltenes Ereignis, dessen Häufigkeit bei vielen Mäuse- und Rattenstämmen untersucht wurde. Bei unbehandelten Ratten und Mäusen (Stämme meist nicht genannt) wurden 1-5 apoptotische Zellen pro 10 000 Leberzellen (SCHULTE-HERMANN et al., 1995b) oder auch 0 bis 2 Apoptosen pro 2 000-3 000 Leberzellen (Wistar-Ratten) nachgewiesen (BURSCH et al., 1990). Mit der Beschreibung von Apoptose-Indizes (Anzahl der apoptotischen Zellen und Körperchen geteilt durch die Gesamtzahl der intakten Leberzellkerne im ausgewerteten Areal) wurden erhebliche Schwankungen in der unbeeinflussten Leber ermittelt. Es wurden in den Publikationen Apoptose-Indizes von 0% bis 0,1% (BURSCH et al., 1990), von 0,01% bis 0,05% (SCHULTE-HERMANN et al., 1995a) und bei adulten B6C3F1-Mäusen von 0,01% bis 0,1% (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b) angegeben. Bei Alderly-Park-Ratten (7 Wochen alt) und Sprague-Dawley-Ratten (6 Wochen alt) wurde über einen Apoptose-Index von $0,1\% \pm 0,09$ berichtet (MAYOL et al., 1992; WHEELDON et al., 1995). Die Auswahl eines geeigneten Nachweissystems für die Apoptose wäre bei einer solch niedrigen Prävalenz sehr

arbeitsaufwendig, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Apoptose experimentell induziert wurde.

In Anlehnung an die Aufteilung der Leber nach RAPPAPORT et al. (1954) in funktionelle Einheiten, die Azini, findet man in den Leberläppchen Zonen mit einem hohen O₂-Partialdruck (periportale Zone 1) und Zonen mit einem geringen O₂-Partialdruck (perivenöse Zone 3). Im Übergang befindet sich die Zone 2. Ebenfalls zonenabhängig stellt sich die Enzymausstattung, der Prozentsatz der stromalen Zellen und die autonome Innervation dar (JUNGERMANN und KATZ, 1989).

Nach dem „Streaming liver“-Modell von ZAJICEK et al. (1985) wandern die Leberzellen im Verlauf ihrer Differenzierung von der periportal (Zone 1) in die perivenöse Zone (Zone 3) des Leberazinus. Bedingt durch diese Migration sind die Apoptosen in der Leber von Ratte und Mensch nicht zufällig verteilt, sondern zeigen ein Maximum in der Zone 3 (SCHULTE-HERMANN et al., 1980; BENEDETTI et al., 1988a, b). Eine Auszählung ergab, dass bei annähernd 38 Prozent der überprüften abführenden Venen (Zone 3) eines oder mehrere apoptotische Körperchen in direkter Nachbarschaft dieser Gefäße nachgewiesen werden konnten. Ein Überblick über das Auftreten der AB in dem ganzen Leberazinus wurde hierbei nicht gegeben. BENEDETTI et al. (1988a) legten durch eine zusätzliche Unterteilung der Zone 3 in Zellreihen dar, dass ca. siebzig Prozent der apoptotischen Körperchen (AB) unmittelbar angrenzend an die abführenden Venen (Zellreihe 1) vorliegen. Bei konstantem Abfall in Richtung Zone 1 (periportal) enthält die Zellreihe vier nur noch annähernd ein Prozent der vorhandenen apoptotischen Körperchen.

Eine Differenzierung nach den verschiedenen Apoptosestadien hat gezeigt, dass das frühe Apoptosestadium mit dem an der Kernmembran sichelförmig kondensierten Chromatin (apoptotische Zellen) nur für wenige Minuten persistiert, so dass diese apoptotischen Zellen nur sehr spärlich anzutreffen sind (BURSCH et al., 1990; GOLDSWORTHY et al., 1996b). Da sehr schnell ein Zerfall in durchschnittlich 2-4 apoptotische Körperchen (AB) erfolgt, machen AB den Hauptanteil der Apoptosen aus (BURSCH et al., 1985; CONSTAN et al., 1996; GOLDSWORTHY et al., 1996b). Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass 10% der AB extrazellulär und 90% phagozytiert innerhalb von Hepatozyten anzutreffen sind. Zudem enthalten 30% (BURSCH et al., 1985) bzw. etwa die Hälfte (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b) der apoptotischen Körperchen Chromatinfragmente.

2.4.2. Apoptose im Rahmen der Involution und Atrophie der Leber nach Cyproteronacetat-Applikation

Neben dem beschriebenen, zahlenmäßig sehr geringen Auftreten der Apoptose in der unbeeinflussten Leber, tritt diese Form des Zelltodes verstärkt nach vorherigem Organwachstum auf (SCHULTE-HERMANN, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a). Durch eine große Anzahl chemischer, hauptsächlich lipophiler Substanzen, kann in der Leber von Ratten und Mäusen ein adaptatives Wachstum induziert werden. Als Beispiele seien Phenobarbital (PB), Cyproteronacetat (CPA), Ethinyl-Estradiol (EE), α -Hexachlorcyclohexan (α -HCH) und Peroxisomenproliferatoren wie Clofibrat und Nafenopin genannt (SCHULTE-HERMANN, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; OCHS et al., 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a; BURSCH et al., 1996). Auch bei Überfütterung oder Trächtigkeit und während der Laktation wird ein adaptatives Leberwachstum beobachtet (SCHULTE-HERMANN, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a).

Im Anschluss an eine verstärkte Zellreplikation in den ersten Tagen der Substanzapplikation werden die Zellen der hyperplastischen Leber scheinbar gegenüber der Stimulation durch Mitogene resistent. Gewichtszunahme und Proliferation sistieren und die Mitogene bewirken nur noch ein Überleben der vermehrt gebildeten Zellen (SCHULTE-HERMANN et al., 1977; 1995b). Über eine Resistenz der Zellen gegenüber mitogener Stimulierung wird auch bei der Leberatrophie, die durch die Einschränkung der Futterzufuhr (Diät) oder durch Hungern verursacht wird, berichtet (GRASL-KRAUPP et al., 1994). Ursächlich für die Mitosesuppression wird eine verstärkte Aktivierung des Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) angesehen (SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b). Die Wirkung dieses Wachstumshormones ist abhängig von dem Zelltyp, auf den es einwirkt. Während in mesenchymalen Geweben die Zellproliferation stimuliert wird, wirkt dieses Wachstumshormon oder Zytokin auf Leberzellen von Ratte und Mensch als potenter Inhibitor des Zellwachstums (NAKAMURA et al., 1985; PETERSEN et al., 1994). Nach partieller Hepatektomie ist TGF- β_1 einer der effektivsten endogenen Wachstumshemmer (JAKOWLEW et al., 1991). Zudem wurde ihm *in vitro* und *in vivo* eine Apoptoseinduktion in der Leber zugeschrieben (FASCIATI und MAIER, 1997).

Im experimentellen Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde das klassische Lebermitogen Cyproteronacetat (CPA = 17-Acetoxy-6-chlor-1 α ,2 α -methylen-4,6-pregnandien-3,20-dion), ein synthetisches Sexualsteroid, zur Wachstumsstimulation der Leber eingesetzt. Es wird therapeutisch bei der Behandlung von Prostatakarzinomen, männlicher Hypersexualität, Hirsutismus und als aktive Komponente in antiakneegenen und kontrazeptiven Pharmaka eingesetzt. Bei hoher Dosierung (900 ppm) wur-

den bei Mäusen vermehrt Schleimhautpolypen am Pylorus, Hyperplasien der Inseln des Pankreas, Nebennierenrindenatrophien, Atrophien der Samenblasen sowie Hyperplasien des Endometriums beobachtet (TUCKER et al., 1996). Desweiteren ist seine Wirkung als Lebertumorpromotor bekannt, die bei Langzeit-Studien mit hoher Dosierung (z.B. 900 ppm über das Futter) an Ratten und Mäusen (CD₁-Mäuse) nachgewiesen wurde (SCHUPPLER und GÜNZEL, 1979; TUCKER et al., 1996). In Untersuchungen mit niedriger Dosierung kam es zu einer geringgradigen Proliferationssteigerung ohne promovierende Wirkung (SCHULTE-HERMANN et al., 1980).

Üblicherweise führt der Entzug eines Hepatomitogens zu einem schnellen Rückgang der zuvor induzierten Lebervergrößerung (BURSCH et al., 1984; 1985; LAUER, 1985; BURSCH et al., 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; ROBERTS et al., 1995), so dass nach Applikationsende von CPA innerhalb weniger Tage annähernd 25% der Leberzell-DNS sowie der Leberzellen entfernt werden. Hierbei werden die überschüssigen Zellen durch Apoptose eliminiert (SCHULTE-HERMANN, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a). SCHULTE-HERMANN et al. (1980) wiesen ein Maximum der Apoptosen nach Entzug von Cyproteronacetat (CPA) in direkter Umgebung der abführenden Lebervenen (Zone 3) nach, wie es auch in der unbeeinflussten Leber zu beobachten ist (BENEDETTI et al., 1988a, b), während ROBERTS et al. (1995) über ein Maximum in der Zone 1 berichten. Aus diesen Publikationen kann nicht entnommen werden, zu welchem Zeitpunkt nach dem Absetzen von CPA das zonenabhängige Auftreten der AB bestimmt wurde.

Um die Apoptose effektiv zu induzieren, entwickelten BURSCH et al. (1984) einen Versuchsplan, der die siebentägige Applikation von CPA in hoher Dosis (130 mg/kg KGW über 4 Tage und 100 mg/kg KGW weitere 3 Tage) an weibliche Wistar-Ratten vorsieht, um dann zwei und vier Tage nach dem Applikationsende die Tiere zu töten. Zu diesen Zeitpunkten ist ein Apoptose-Index von etwa 4% (2 Tage) bzw. 1% (4 Tage) zu erwarten.

Gleichzeitige Bestimmung der proliferierenden Zellen durch BrdU-Markierung ergaben, dass bei einer Markierung von 58% aller apoptotischer Hepatozyten etwa 14% der apoptotischen Körperchen ebenfalls eine BrdU-Inkorporation aufwiesen (BURSCH et al., 1985; CONSTAN et al., 1996). In Untersuchungen von ROBERTS et al. (1995) an Zellkulturen waren dagegen nur 9,7% der apoptotischen Körperchen so markierbar. Im Zuge der gesteigerten Apoptoserate, welche die Leber nach Entzug des Hepatomitogens auf das Ausgangsgewicht zurückführt, werden nur knapp 10% der neugebildeten Zellen entfernt. Dagegen weist der größere Teil (>90%) der apoptotischen Zellen kein Anzeichen einer vorherigen DNS-Synthese auf (ROBERTS et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass bevorzugt die älteren Zellen

durch Apoptose entfernt werden, die sich zuvor nicht an dem Leberzellwachstum beteiligt haben (BURSCH et al., 1985).

2.4.3. Einfluss auf die Apoptose durch Nährstoffzufuhr und Tag-Nacht-Rhythmus

Die Lebergröße bzw. das Nettowachstum der Leber wird auch von der Art und der Menge der aufgenommenen Nährstoffe bestimmt. Eine Nahrungsreduktion oder ein kompletter Futterentzug führt durch schrittweise Eliminierung der Zellen mittels Apoptose zu einer Abnahme der Lebermasse (SCHULTE-HERMANN et al., 1988; GRASL-KRAUPP et al., 1994; SCHULTE-HERMANN et al., 1995b; KOLAJA et al., 1996). Ähnlich induziert auch die partielle Unterbrechung der portalen Blutzufuhr, vermutlich durch Nährstoffmangel, eine verstärkte apoptotische Aktivität in den perivenösen Regionen der Rattenleber. Der Zellverlust beschränkt sich bei Erhalt der Leberstruktur auf die ersten Tage und führt zu einer Größenreduktion der Leberlappen (KERR, 1965; 1971). Darüber hinaus zeigen die Apoptose-Indizes in Abhängigkeit vom Tag-Nacht-Rhythmus zur Proliferation gegenläufige Schwankungen (LAUER, 1985; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; BURSCH et al., 1994; GRASL-KRAUPP et al., 1994). Bei Ratten ergibt sich ein zirkadianer Rhythmus aus ihrem physiologischen diurnalen Fressverhalten. Am Ende der Lichtphase (Ende der Hungerphase) wurden die höchsten Apoptose-Indizes festgestellt. Im Verlauf der Nacht (Zeit der Futteraufnahme) sinkt die Anzahl der Apoptosen mit der Futteraufnahme und erreicht am Tagesanfang ihr Minimum (SCHULTE-HERMANN et al., 1988; GRASL-KRAUPP et al., 1994). Dies bedeutet, dass bei unverändertem Tag-Nacht-Rhythmus und ad libitum Fütterung eine bei Tagesbeginn durchgeführte Tötung der Versuchstiere eine geringe Apoptoserate zur Folge hat. Das Maximum der Proliferation ist dagegen bei normalem Tag/Nacht-Rhythmus um 10 Uhr zu erwarten (SCHULTE-HERMANN und LANDGRAF, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; GRASL-KRAUPP et al., 1994).

2.4.4. Apoptose nach toxischer Leberschädigung

Dass Apoptose und Nekrose keine endgültig trennbaren Ereignisse darstellen oder möglicherweise ein Kontinuum sind, zeigen Untersuchungen z.B. mit Thioacetamid. Drei und sechs Stunden nach dessen Applikation treten apoptotische Leberzellen in der perivenösen Zone der Rattenleber auf, die weitere sechs Stunden später von Nekrosen mit begleitender Entzündung abgelöst werden (LEDDA-COLUMBANO et al., 1991). Ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch zugrunde geht, ist vom Typ und

dem Ausmaß der Schädigung sowie der Dauer der Applikation abhängig. Somit könnte eine Zelle als frühe Antwort auf die Schädigung ihr Apoptoseprogramm auslösen, bei anhaltender Beeinträchtigung jedoch passiv in die Nekrose übergehen (SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b). Untersuchungen mit Heliotrin, 1,1-Dichloroethylen, Dimethylnitrosamin (DMN), Thioacetamid und Cycloheximid (CHX) haben gezeigt, dass die Induktion beider Phänomene auch dosisabhängig sein kann (KERR, 1969; REYNOLDS et al., 1984; PRITCHARD und BUTLER, 1989; LEDDA-COLUMBANO et al., 1991; 1992). Nach einer hohen Dosis von z.B. Dimethylnitrosamin dominiert der nekrotische Zelltod, wohingegen bei niedriger Dosierung Apoptose-ähnliche Veränderungen beobachtet werden konnten (PRITCHARD und BUTLER, 1989). Ein gleichzeitiges Auftreten von Apoptose und Nekrose wurde nach der Gabe von 1,1-Dichlorethylen (REYNOLDS et al., 1984) und Acetaminophen (Paracetamol) (RAY und JENA, 2000) festgestellt. Die einmalige Applikation von N-Nitrosomorpholin bewirkte eine Persistenz der erhöhten apoptotischen Aktivität für mehrere Wochen (SCHULTE-HERMANN et al., 1995a). Ebenso kann durch Ethanolgabe in der Ratten- und Mäuseleber die Apoptose von Hepatozyten induziert werden (BENEDETTI et al., 1988a; GOLDIN et al., 1993). Hierbei konnte, neben der Erhöhung der Anzahl apoptotischer Körperchen, eine Verkürzung der Lebensspanne der Hepatozyten festgestellt werden, welche eine leichte Verschiebung der Apoptosehäufigkeiten zur Folge hatte. Im Gegensatz zu der Lokalisation der Apoptosen in direkter Umgebung der abführenden Venen (Zellreihe 1 der Zone 3) in der normalen Leber (Kap. 2.4.1.), konnten Apoptosen nach der Applikation von Ethanol nun auch in größeren Abständen von diesen Gefäßen (Zellreihe 5) nachgewiesen werden (BENEDETTI et al., 1988a).

Weitere Informationen über die Wirkung von Chemikalien auf die Leber sind dem Kapitel 2.4.2. zu entnehmen.

2.5. Apoptoserate und Nettoproliferationsrate

Die Größe einer Zellpopulation wird von der Rate der Zellteilungen sowie der Zelluntergänge bestimmt. Zur Beurteilung des Nettowachstums sind sowohl Daten über die Häufigkeit von Zellteilung und –untergang als auch über die Dauer dieser Vorgänge erforderlich. Um die Dauer der Prozesse bestimmen zu können, muss bekannt sein, welchen Zeitraum die eingesetzte Nachweismethode abdeckt, d.h. bei Proliferationsmessungen muss z.B. die Markierungszeit (Puls-Labeling über einige Stunden, osmotische Pumpe für mehrere Tage) bekannt sein (GOLDSWORTHY et al., 1995; 1996b).

Zur Bestimmung des lichtmikroskopisch sichtbaren Zeitfensters der Apoptose kann in der Leber die Hemmbarkeit durch Mitogene (z.B. CPA, PB, α -HCH und Nafenopin) genutzt werden (BURSCH et al., 1984; 1986; 1990). Wird nach der Apoptoseinduktion (z.B. durch siebentägige CPA-Applikation mit anschließendem Entzug) erneut das Mitogen verabreicht, beginnt nach einer kurzen, scheinbar reaktionslosen Phase von einer Stunde die Entfernung der apoptotischen Körperchen (BURSCH et al., 1990). Die lichtmikroskopisch sichtbare Eliminationsphase dauert durchschnittlich zweieinhalb bis drei Stunden (BURSCH et al., 1990; 1992; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b). Das Zeitfenster von zweieinhalb bis drei Stunden gilt auch für die Apoptose von Mäuse-Enterozyten nach radioaktiver Bestrahlung, nicht aber für Nebennierenrindenzellen, denen eine Eliminationshalbwertszeit von 18 Stunden zugeschrieben wird (POTTEN et al., 1978; WYLLIE et al., 1980; IJIRI und POTTEN, 1983; BURSCH et al., 1990). In Foci der Leber wurden etwa zehnfach höhere Apoptose-Indizes (Anzahl der Apoptosen bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen) gegenüber dem extrafokalem Lebergewebe festgestellt (BURSCH et al., 1984; 1990). Mit dem gleichen Versuchsprinzip (CPA-Modell) konnte unter Verwendung von Phenobarbital festgestellt werden, dass kein zeitlicher Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit der Apoptosen von unveränderten und präneoplastischen Hepatozyten besteht und somit den zehnfach höheren Apoptose-Indizes in Foci keine langsamere Degradationsgeschwindigkeit zugrunde liegt (BURSCH et al., 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b).

Mit der folgenden Formel kann der Zellverlust pro Stunde errechnet werden (BURSCH et al., 1990):

$$\text{Zellverlust/Stunde} = \frac{i \times f}{d}$$

i = Apoptose-Prävalenz
f = Korrekturfaktor für die Bildung von mehr als einem AB aus einer Zelle (= 0,5)
d = Zeitraum, in dem der Prozess lichtmikroskopisch sichtbar ist (= 3 Std.)

Hieraus ergeben sich Apoptoseraten von 0,5% (Leber in der Phase der Regression) bzw. 2%-5% pro Stunde (präneoplastische Herde) (BURSCH et al., 1990). Für die Kalkulation der täglichen Zellverlust-Rate muss der zirkadiane Rhythmus der Zellproliferation und der Apoptose berücksichtigt werden (SCHULTE-HERMANN und LANDGRAF, 1974; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; BURSCH et al., 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b). STINCHCOMBE (1996) ist zudem der Meinung, dass mit dem Alter der Tiere die Abbaugeschwindigkeit der AB abnimmt und dies zusätzlich in die Berechnung der Apoptoserate einbezogen werden muss.

2.6. Andere Formen des aktiven Zelltodes

Die Apoptose ist nicht der einzige Typ des "aktiven Zelltodes" (SCHWEICHEL und MERKER, 1973; BURSCH et al., 1996; ZAKERI et al., 1996; SCHULTE-HERMANN et al., 1997; BURSCH et al., 2000). So konnte bei der Rückbildung eines hormonabhängigen Brusttumors nach Ovariectomie ein deutlicher Anstieg lysosomaler Enzyme in zugrunde gehenden Zellen beobachtet werden, was nicht mit dem Erscheinungsbild der Apoptose übereinstimmt (LANZEROTTI und GULLINO, 1972). SCHWEICHEL und MERKER (1973) beschrieben im sich entwickelnden Embryo drei morphologisch unterschiedliche Arten des Zelltodes (Tab. 5). Diese nicht ausschließlich apoptotischen Typen des aktiven Zelltodes wurden nicht nur während der Embryogenese, sondern auch bei Insekten, in bestimmten Säugetierorganen, in Tumoren und auch im sich entwickelnden Nervengewebe beobachtet (SCHULTE-HERMANN et al., 1997).

Tab. 5: Morphologische Unterscheidung des aktiven Zelltodes in verschiedenen Geweben:

TYP	CHARAKTERISTIKA	BEISPIELE
Typ I	Charakterisiert durch Kondensation und Fragmentation der Zelle sowie Phagozytose der Zellfragmente; dieser Typ ist vermutlich der Apoptose gleichzusetzen	Pränatal in den interdigitalen „nekrotischen“ Zone bei der Finger- bzw. Zehenformung; beim Zelltod der Spinalganglien; Rattenleber; Thymozyten
Typ II	Zellen werden nach Bildung autophagischer Vakuolen durch ihre eigenen Lysosomen zerstört (autophagischer Zelltod)	Epitheliales Gewebe des Mesonephron bei Hühnern; zentral liegende Epithelzellen bei der Bildung der sekundären Darmhöhle; Schluss des Ductus arteriosus Botalli; epitheliale Platte beim Schluss der Gaumenspalte; Speicheldrüsen und Muskeln von Insekten; Amphibien-schwanz bei der Metamorphose; Rückbildung der Milchdrüse bei der Ratte; humane Brustkrebszellen (MCF-7) nach Einwirkung eines Antiöstrogens (Tamoxifen)
Typ III	Zellfragmentierung ohne Involvement des lysosomalen Systems; keine anschließende Phagozytose	Vakuolisierte Knorpelzellen während der Mineralisation; endotheliale Zellen großer Gefäße bei Rattenembryos (10.-12. Tag)
<p style="text-align: center;"><u>Zitate:</u> SCHWEICHEL und MERKER, 1973; BURSCH et al., 1996; ZAKERI et al., 1996; BURSCH et al., 2000</p>		

Der Zelltod Typ II tritt bei der Entwicklung multizellulärer Organismen hauptsächlich in den Regionen auf, wo Organareale oder Organanlagen in toto entfernt werden (SCHWEICHEL und MERKER, 1973). Wie bei der Apoptose konnte auch für den Typ II eine exogene Beeinflussung des Zelltodes beobachtet werden; z.B. kann der Tod von humanen Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) durch 3-Methyladenin, einem Inhibitor der Bildung autophagischer Vakuolen, gehemmt werden. Ergänzende Versuche ergaben, dass die Apoptose der Leberzelle durch Applikation dieser Substanz nicht geblockt werden kann (SCHULTE-HERMANN et al., 1997). Durch Überlappungen zwischen diesen Formen des aktiven Zelltodes ist eine sichere Abgrenzung allerdings nicht immer möglich.

Weiterhin muss die Apoptose von der Nekrose sowie der terminalen Differenzierung (z.B. der Keratinozyten in der Haut) abgegrenzt werden (LEVIN, 1995). Darüber hinaus sind apoptotische Körperchen mit Chromatinresten bei extrazellulärer Lage von mitotischen Zellen in der Telophase und Lymphozyten mit ihrem meist sehr dichten Kernchromatin sowie intrazelluläre AB ohne sichtbare Chromatinbestandteile von autophagischen Vakuolen zu differenzieren (DETER, 1971; BOLENDER und WEIBEL, 1973; PFEIFER, 1982; BURSCH et al., 1985; BENEDETTI et al., 1988a; WIJSMAN et al., 1993).

Obwohl es einige Überlappungen zwischen der Nekrose und der Apoptose gibt, deutet die Morphologie, der Zeitpunkt des Auftretens, die Gewebelokalisation, sowie der Typ und die Stärke des induzierenden Stimulus darauf hin, dass es sich um zwei verschiedene Prozesse handelt (GOLDSWORTHY et al., 1995). So führt z.B. der vollständige Verschluss der Lebervene zu einer perivenösen Koagulationsnekrose in der Leber, wohingegen eine partielle Verlegung Apoptose bewirkt (KERR, 1965).

In der folgenden Tabelle 6 sind die Charakteristika der Nekrose, die sie von der Apoptose (siehe auch Kapitel 2.7.1. und 2.7.2.) unterscheiden, zusammengefasst:

Tab. 6: Charakteristika der Nekrose (Unterschiede zur Apoptose).

NEKROSE
<p><u>Ursachen</u></p> <p>Massive Schädigung von Zellen; schnelle Ausschaltung der Hauptzellfunktionen sowie Kollaps der internen Homöostase.</p>
<p><u>Beeinflussung</u></p> <p>Keine Hemmung durch gewebespezifische Wachstumsfaktoren und Mitogene.</p>
<p><u>Makroskopie</u></p> <p>In einigen Fällen mit dem unbewaffnetem Auge zu erkennen.</p>
<p><u>Lichtmikroskopie</u></p> <p>Zellschwellung durch Verlust der Volumenregulation mit Plasmamembranschädigung und in den meisten Fällen erhebliche Schädigung des Zellkerns. Meist Zellgruppen betroffen und somit häufig über mehrere Wochen nachweisbar; eosinophiles „ghosting“ der ganzen Zelle; die frei werdenden Zellbestandteile wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Entzündungsreaktion). Die An- oder Abwesenheit mononukleärer Entzündungszellen ist dennoch kein zuverlässiges Merkmal zur Abgrenzung der Nekrose von der Apoptose (ausgedehntes Auftreten von Apoptose in der Embryogenese kann gleichfalls von Entzündungszellinfiltration begleitet sein).</p>
<p><u>Elektronenmikroskopie</u></p> <p><u>Chromatin und Nukleolus:</u> In kleinen Aggregaten mit lockerer Textur randständig angeordnetes Chromatin; verschwindet evtl., wenn Kernmembran zerstört ist. Der Nukleolus liegt bis zur Zytoplasmadegradation als kompakter Körper vor.</p> <p><u>Kernmembran:</u> Poren der Kernmembran bis zur Zytoplasmadegradierung erhalten; evtl. zeitlich parallel mit anderen Organellen zerstört.</p> <p><u>Plasmamembran, Zytoplasma und Zellorganellen:</u> Frühzeitiger Funktionsausfall der Ionenpumpen. Dies führt zu einer Schädigung des Zytoskeletts und einer Zell- und Organellenschwellung. Ein Überschuss an intrazellulärem Kalzium führt zu einer irreversiblen Mitochondriendysfunktion, deren deutliche Schwellung als ein Zeichen für Irreversibilität angesehen wird. Zellformveränderungen und eine wie kochend erscheinende Zelloberfläche (Plasmamembranausstülpungen ohne Zellorganellen: „Blebs“). Am Ende Membranruptur und Zerstörung der Organellen.</p> <p>Im Endstadium kommt es zu einer Ruptur der Zellkernmembran, der Organellen und der Plasmamembran sowie einem Chromatinverlust aus den aufgelösten Kernen (Karyolyse). Die Zellreste werden von Makrophagen und anderen zur Phagozytose befähigten Zellen entfernt.</p>
<p><u>Zitate:</u></p> <p>KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; MAJNO und JORIS, 1995; RAY und JENA, 2000</p>

Da die Apoptose in der Endphase einen sekundär nekrotischen Prozess durchläuft, war es nötig, die Nomenklatur zu optimieren und den eigentlichen Zelltod mit vorheriger Zellschrumpfung (Apoptose) oder -schwellung (Nekrose) von den sich anschließenden nekrotischen Veränderungen zu differenzieren. Nach einem letalen Insult der Zelle kommt es zu einer Reaktionskaskade: 1. Die meist reversible präletale Schädigung, 2. der "Point of no return" bzw. der eigentliche Zelltod, und im Anschluss beginnen 3. die "post mortem" oder autolytischen Veränderungen - die eigentliche Nekrose. Aber nicht jeder Zelltod muss von degenerativen Veränderungen gefolgt werden, worauf auch der Zweck der Fixation – der langzeitige strukturelle Erhalt von totem Gewebe - beruht. Für die präletale Schwellung vor dem Eintritt des Zelltodes wurde der Begriff "Oncosis" (griechisch: Schwellung) eingeführt (RECKLINGHAUSEN, 1910; MAJNO und JORIS, 1995); die Unterscheidung zwischen der präletalen Apoptose und der Onkose basiert folglich auf dem Zellvolumen sowie der Kernmorphologie. Der Begriff "Nekrose" wird von einigen Autoren nur noch für das Endstadium beider Prozesse (Apoptose und Onkose) befürwortet (MAJNO und JORIS, 1995; TRUMP et al., 1997).

Wie bereits in Kapitel 2.4.4. beschrieben, können einige Hepatotoxine in der Leber dosisabhängig sowohl Apoptose als auch Nekrose induzieren (KERR, 1969; REYNOLDS et al., 1984; PRITCHARD und BUTLER, 1989; LEDDA-COLUMBANO et al., 1991; 1992). Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) ist bekannt dafür, perivenöse Lebernekrosen (AGARWAL und MEHENDALE, 1983; PRITCHARD und BUTLER, 1989) mit nachfolgender Fibrose zu verursachen (BRUCKNER et al., 1986). Diese Substanz wurde aufgrund dieser Eigenschaft in einigen Studien - wie auch in der vorliegenden Arbeit - für Spezifitätskontrollen bei Studien von Nachweissystemen für die Apoptose eingesetzt. SHI und seine Kollegen (1998) haben in Lebern von 7-9 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten nach der einmaligen intraperitonealen Applikation von CCl_4 (0,3 mg/kg KGW) ein Nebeneinander von Apoptose und Nekrose nachgewiesen. Es wurde eine Analyse der auftretenden DNS-Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (AGE – Auftrennung der DNS-Fragmente im elektrischen Feld) sowie mit der TUNEL-Methode (Markierung der DNS-Fragmente auf der Einzelzellebene mit Hilfe der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase) durchgeführt. Parallel hierzu erfolgte die elektronenmikroskopische Beurteilung der geschädigten Leberzellen. Drei Stunden nach der Applikation von CCl_4 traten in der intermediären Zone der Leberazini vereinzelt apoptotische Zellkerne, charakterisiert durch sichelförmige Chromatinkondensation, sowohl bei ballonierten als auch bei "normalen" Hepatozyten auf. Drei Stunden später wurden die ersten apoptotischen Körperchen und Kernfragmente beobachtet. In der perivenösen Zone konnten in der Zeit zwischen sechs und zwölf Stunden nach der Toxingabe die ersten nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Auch nach der einmaligen Applikation von Thioacet-amid

traten zunächst apoptotische Leberzellen in der perivenösen Zone der Rattenleber auf (1.-6. Stunde nach Applikation), die von nekrotischen Zellen (12. Stunde) mit begleitender Entzündung abgelöst wurden (LEDDA-COLUMBANO et al., 1991). Ähnlich konnte dies nach einer einzigen hohen Dosis des genotoxischen Karzinogens Dimethylnitrosamin beobachtet werden (PRITCHARD und BUTLER, 1989). Ein zeitgleiches Auftreten von Apoptose und Nekrose konnte nach der Gabe von 1,1-Dichlorethylen aufgezeigt werden (REYNOLDS et al., 1984).

2.7. Charakteristika der Apoptose und ihre Nachweismethoden

Die an Paraffin-eingebetteten Leberschnitten am häufigsten angewandten Nachweismethoden zur Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen und Körperchen sind die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E - Standardmethode) sowie die Markierung der DNS-Fragmente (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)). Die sicherste Methode stellt die in Routinestudien allerdings nicht praktikierbare Elektronenmikroskopie dar (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Zusätzlich wird seit kurzer Zeit auch die fluoreszierende Eigenschaft der kondensierten und damit stärker eosinophilen apoptotischen Körperchen sowie der Nachweis von TGF- β_1 und TGF- β -"latent associated protein" (TGF- β -LAP) für die Detektion genutzt (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Mit der Markierung des Phospholipids Phosphatidylserin, das während der Apoptose hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurde eine weitere Nachweismethode aufgezeigt, die seit kurzem nicht nur in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden kann (KOOPMAN et al., 1994; VAN ENGELAND et al., 1998).

Mit diesen Nachweismethoden werden apoptotische Zellen und Körperchen über unterschiedlich lange Zeitspannen während des Apoptoseprozesses erfasst (GOLDSWORTHY et al., 1996b; LABAT-MOLEUR et al., 1998).

2.7.1. Elektronenmikroskopie

Am sichersten ist es, die Apoptose ultrastrukturell mit dem Elektronenmikroskop (EM) von den differentialdiagnostisch zu berücksichtigenden Objekten, wie der Nekrose, der Mitose und den Zytoplasmainschlüssen, abzugrenzen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; FEHSEL et al., 1994; GOLDSWORTHY et al., 1996b).

Anhand des elektronen- und lichtmikroskopischen Bildes wurden die morphologischen Kriterien der Apoptose definiert und die einzelnen Reaktionsschritte der Apoptose erfasst (KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980):

Bei den überwiegend einzeln liegenden apoptotischen Zellen aggregiert zunächst ein Großteil des Chromatins in kompakten granulären Massen halbmond- oder sichelförmig an der Kernmembran. Die zunächst abnorm gewellte Kernmembran kerbt sich zunehmend ein, bis schließlich einzelne Kernfragmente präsent werden. Die Zellen schrumpfen und runden sich ab, so dass in soliden Geweben häufig ein elektronendurchgängiger Hof, ein sogenannter "Halo", sichtbar wird. Die Schrumpfung resultiert zum großen Teil aus der Abgabe von Wasser an die Umgebung über das dilatierte endoplasmatische Retikulum (ER), dessen Membran zum Teil mit der Plasmamembran verschmilzt. Fortschreitende Kondensation des Zytoplasmas führt zu einer Zusammenballung der langfristig funktionsfähigen Organellen. Ohne Synthese neuer Membranabschnitte bilden sich infolge der Zytoplasmaverdichtung Plasmamembranausstülpungen, die sich abschnüren und schließlich Membran-umschlossene apoptotische Körperchen (AB) mit oder ohne Kernfragmente bilden. Durch weitere Schrumpfung der AB sind auch diese häufig von einem "Halo" umgeben.

Meist übernehmen angrenzende Epithelzellen oder Makrophagen die Aufgabe einer raschen Phagozytose. In Tumoren sind auch die neoplastischen Nachbarzellen an diesem Prozess beteiligt (BURSCH et al., 1990). Bei tubulärer Gewebestruktur werden die Zellen dagegen in das angrenzende Lumen abgegeben und "abgeschwemmt". Die aufgenommenen apoptotischen Körper werden durch das lysosomale System der "Wirtszelle" abgebaut, was als "sekundäre Nekrose" bezeichnet wird. Zurück bleibt eine kleine Menge nicht verdaubaren Materials, der sogenannte "Restkörper". In der Regel sind keine Anzeichen einer exsudativen Entzündung zu beobachten, wie sie beim nekrotischen Zelltod zu erwarten sind. Kommt es in der Embryogenese zum Absterben einer großen Gruppe von apoptotischen Zellen, treten zahlreiche Phagozyten auf, bei denen es sich nicht um zirkulierende Monozyten aus dem Blut handelt (SAUNDERS, 1966; KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Es sind entweder Gewebemakrophagen oder benachbarte Parenchymzellen (SAUNDERS, 1966).

Mittels der Elektronenmikroskopie sind quantitative Auswertungen in einem größeren Studienumfang, wie er in Routinestudien notwendig ist, allerdings aufgrund des Kosten- und Zeitaufwandes nicht praktikabel.

2.7.2. Standard-Lichtmikroskopie

Der morphologische Nachweis der Apoptosen am Standard-H&E-gefärbten Schnitt gilt derzeit als Standardmethode zum Apoptosenachweis (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b; SLOOP et al., 1999).

Im Vergleich zur Elektronenmikroskopie können in der Standard-Lichtmikroskopie nicht alle unter Kapitel 2.7.1. beschriebenen Veränderungen erkannt werden (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; GOLDSWORTHY et al., 1996b; RAY und JENA, 2000):

Das früheste lichtmikroskopisch erkennbare Zeichen der Apoptose ist auch bei Leberzellen durch Zytoplasma- und Chromatinkondensation charakterisiert. Das Chromatin lagert sich sichelförmig der Kernmembran an. Schrumpfung durch Reduktion des Plasmavolumens (Eosinophilieverstärkung) bei gleichzeitiger Abrundung der Zelle und Verlust des Kontaktes zu den Nachbarzellen ("Halo"-Bildung) kann ebenfalls beobachtet werden. Da dieses Stadium nur wenige Minuten dauert, kann es im Schnittpräparat nur selten nachgewiesen werden. Die durch Fragmentierung entstehenden apoptotischen Körperchen (AB) haben unterschiedliche, meist glattrandige Formen und Größen und enthalten keine bis mehrere basophile Chromatinreste. Kleine AB werden bei der lichtmikroskopischen Betrachtung häufig nur erkannt, wenn sie derartige Chromatinreste enthalten. Eine schnelle Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Hepatozyten erklärt die häufige intrazelluläre Lage (90%) der AB. Teilweise verursachen sie eine Verdrängung und Verformung des Kernes der "Gastzelle", so dass dieser bei randständiger Lage eine bohnenförmige Gestalt annimmt. Desweiteren werden sie oft von einem ungefärbten "Halo" umgeben, der vermutlich durch weitere Schrumpfung nach der Phagozytose entsteht. Dieser "Halo" kann zur besseren Erkennung bei der lichtmikroskopischen Betrachtung beitragen. Später im Verlauf des Prozesses liefern die intrazellulären Ansammlungen zahlreicher Kernfragmente das Bild einer Karyorrhesis (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; GOLDSWORTHY et al., 1996b), allerdings nicht des Makrophagen-eigenen Zellkerns.

Die geschilderten Veränderungen können nicht bei allen Zelltypen und in allen Organen beobachtet werden. Kortikale Thymozyten fragmentieren ebenso wie ihre Kerne sehr begrenzt (WYLLIE et al., 1980; CHAPMAN et al., 1995). Humane lymphatische Leukämiezellen (MOLT-4 Zellen) bilden keine apoptotischen Körperchen, humane promyelozytische Leukämiezellen (HL60-Zellen) dagegen schon (CHAPMAN et al., 1995). Bei Skelettmuskelzellen wird die Fragmentierung wahrscheinlich verhindert, indem bei der engen Packung der Myofilamente Verstrebungen entstehen (KERR et al., 1974). Die Tonofilamente der Keratinozyten unterbinden ausgeprägte Oberflächenveränderungen, so dass nur kleine Protuberanzen zu beobachten sind (WEEDON et al., 1979).

2.7.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wird vor allem als Auflichtmethode betrieben (BUCHER und WARTENBERG, 1991). Die Fluorochrome leuchten auf dunklem Hintergrund auf (BURCK, 1988; BUCHER und WARTENBERG, 1991). Eosin (Tetrabromfluoreszein-Natrium) gehört physikalisch-chemisch wie z.B. Fluoreszein oder Rhodamin in die Gruppe der Xanthen-Derivate und wie Brillantsulphoflavin zu den anionischen oder sauren Fluorochromen (BURCK, 1988).

Bei der Fluoreszenzmikroskopie nutzt man zum Nachweis der Apoptose die Eigenschaft von Eosin, das von ihm absorbierte Licht in einer anderen Wellenlänge wieder abzustrahlen sowie die Tatsache, dass apoptotische Körperchen eine deutlich höhere Eosinophilie als die umgebenden Zellen aufweisen. Hierzu werden nach STINCHCOMBE (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996) möglichst dünne Gewebeschnitte mit 0,4%iger alkoholischer Eosin- sowie schwacher Hämatoxylin-Gegenfärbung gefärbt. Hierbei ist zu beachten, dass auch andere Zytoplasmainschlüsse (z.B. Proteintropfen) durch ihre Eosinophilie eine fluoreszierende Eigenschaft aufweisen können (ESPADA et al., 1993; STINCHCOMBE et al., 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Mit zunehmendem Gehalt an Kernfragmenten wird die Fluoreszenz der apoptotischen Körperchen maskiert (STINCHCOMBE, 1996). Darüber hinaus ist eine gute Entparaffinierung wichtig, da Reste des Einbettmediums Fluoreszenz vortäuschen können. Ähnliche Effekte sind bei der Verwendung eines Großteils der gewöhnlichen Eindeckmittel zu beobachten, weshalb z.B. synthetische Harze (Entellan, Merck), Paraffinöl oder Glycerin eingesetzt werden sollten (BURCK, 1988).

2.7.4. Nachweis der DNS-Fragmente

Die unter Kap. 2.2.4. beschriebene internukleosomale DNS-Fragmentierung während der Apoptose kann zum Nachweis apoptotischer Zellen und Körperchen herangezogen werden. Unabhängig vom Apoptose-induzierenden Stimulus kommt es in der Regel zu einer Apoptose-spezifischen DNS-Fragmentierung, bei der bestimmte DNS-Fragmentlängen auftreten (ARENDS et al., 1990; ALISON und SARRAF, 1995). Abweichend hiervon wird in Einzelfällen von einer Bildung längerer Fragmente bzw. vom Fehlen einer DNS-Fragmentierung berichtet (COLLINS et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1992a; 1993; ORMEROD et al., 1994; DOUGLAS et al., 1995; COLLINS et al., 1997). Auch nekrotische Zellen weisen zum Teil eine solche DNS-Fragmentierung auf (ALISON und SARRAF, 1995; GRASL-KRAUPP et al., 1995).

2.7.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Eine der ältesten Methode zur Visualisierung der DNS-Fragmente ist die Auftrennung der aus Zellpopulationen extrahierten DNS auf dem Agarose-Gel. In der Agarose-Gelelektrophorese (AGE) werden die Fragmente nach einer Deproteinisierung nach Molekulargewicht getrennt. Dies spiegelt sich bei der Apoptose in einer typischen sogenannten "DNS-Leiter" wieder.

Die eher zufällige Fragmentierung der DNS bei nekrotischen Zellen hinterlässt auf dem Gel dagegen ein "Schmierspur"-artiges Aussehen (ALISON und SARRAF, 1995; COLLINS et al., 1997; DONG et al., 1997). Dennoch kann nicht immer eine klare Aussage über die zugrunde liegende Todesform getroffen werden. Paralleles Auftreten von DNS-Leiter und Schmierspur werden mit der asynchronen Induktion der Apoptose innerhalb einer Zellpopulation sowie durch eine teilweise vorhandene unspezifische Fragmentierung erklärt. Somit spricht der Nachweis einer "DNS-Leiter" zwar für, das Fehlen aber nicht zwangsläufig gegen die Apoptose (GRASL-KRAUPP et al., 1995; SCHULTE-HERMANN et al., 1995b; GOLDSWORTHY et al., 1996b; COLLINS et al., 1997; DONG et al., 1997). Extrahierte DNS aus Lebergewebe mit ischämischer Nekrose kann nach der Auftrennung ebenfalls eine "DNS-Leiter" ergeben (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Der untersuchte Zelltyp beeinflusst gleichfalls das Ergebnis; z.B. werden insbesondere bei der Untersuchung der Leber die für die Apoptose spezifischen DNS-Fragmente, auf denen solche "DNS-Leitern" beruhen, nicht immer erhalten (GRASL-KRAUPP et al., 1995; DONG et al., 1997).

2.7.4.2. In situ-Nachweis der DNS-Fragmente

Eine weitere Methode zum Nachweis der DNS-Fragmente basiert auf der enzymvermittelten Kopplung von gelabelten Desoxy-Uridintriphosphaten (dUTP) an die OH-Enden der DNS-Strangbrüche. Im Unterschied zur AGE kann sie auch an in Paraffin eingebettetem, archiviertem Gewebe durchgeführt werden, so dass hierbei die apoptotischen Zellen und Körperchen auf Einzelzellbasis nach ihrer topographischen Lage im Gewebe sowie hinsichtlich des betroffenen Zelltyps angesprochen werden können (GOLD et al., 1993; FEHSEL et al., 1994; CONSTAN et al., 1996; ITO und OTSUKI, 1998; VALENTE et al., 1998). Allerdings ist auch bei dieser Methode eine endgültige Differenzierung der Apoptosen von den manchmal ebenfalls mittels dieser Methode markierten nekrotischen Zellen ohne zusätzliche morphologische Kontrolle nicht möglich (WIJSMAN et al., 1993; DAVISON et al., 1995; GRASL-KRAUPP et al., 1995).

Es kann entweder ein direkter Nachweis mit Fluoreszein-dUTP (LI et al., 1995) oder ein indirekter Nachweis über den Einbau von Biotin-dUTP (KISHIMOTO et al., 1992;

GORCZYCA et al., 1993a, b; WIJSMAN et al., 1993; FEHSEL et al., 1994; CHAPMAN et al., 1995; LI et al., 1995) bzw. Digoxigenin-dUTP (GOLD et al., 1993; BROMIDGE et al., 1995; KONG und RINGER, 1995; LI et al., 1995; WHEELDON et al., 1995) erfolgen. Bei der indirekten Methode werden die an die DNS-Fragmente gebundenen Moleküle in einem zweiten Schritt durch ein immunhistologisches Verfahren sichtbar gemacht. Die Reaktion der Nukleotidtriphosphate mit den DNS-Enden der Strangbrüche wird durch den Einsatz von Enzymen katalysiert, die in Tabelle 7 dargestellt sind. Die Spezifität und Effektivität der einzelnen Enzyme wird in den Publikationen widersprüchlich diskutiert. Die Nomenklatur schafft einige Verwirrung, aber die Bezeichnung "TUNEL" (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling) steht einheitlich für den Nachweis der Apoptose unter Einsatz der "terminalen Transferase".

Tab. 7: Angewandte Enzyme bei der TUNEL-Methode

Enzym	Eigenheiten
Terminale Transferase	Die terminale Transferase benötigt im Gegensatz zu der DNS-Polymerase kein template, um die gelabelten Nukleotide an die DNS-Enden zu addieren (YAMADORI et al., 1998). Da dieses Enzym die Kopplung der Nukleotide an Doppelstrangbrüche (ds-Brüche) katalysiert, eignet es sich für den Nachweis der Apoptose, für welche derartige Strangbrüche typisch sind (GORCZYCA et al., 1993a, b; GRASL-KRAUPP et al., 1995; NEGOESCU et al., 1996).
E. coli DNS-Polymerase I	Da die Polymerase dagegen die markierten Nukleotide nur an Einzelstrangbrüche addiert, ist sie weniger für den Nachweis der während der Apoptose hauptsächlich entstehenden ds-Brüche geeignet (GRASL-KRAUPP et al., 1995). Auch NAKAMURA et al. (1995) konnten mittels der Polymerase keine Apoptosen markieren. Demgegenüber sprechen FEHSEL et al. (1994) diesem Enzym aber eine höhere Sensitivität als der terminalen Transferase zu.
Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I	Unter Anwendung dieses Enzyms wurden ähnliche Resultate bei dem quantitativen Nachweis der Apoptose erhalten, wie bei der Identifizierung nach morphologischen Kriterien (GAVRIELI et al., 1992; ANSARI et al., 1993; GOLD et al., 1993; WIJSMAN et al., 1993; DAVISON et al., 1995). Die Anwendbarkeit dieses Enzyms für den ausschließlichen Nachweis von Apoptosen wird allerdings von ANSARI et al. (1993) bestritten.

Die DNS-Enden werden durch Anhängung mehrerer digoxigener Nukleotide verlängert (Amplifizierung), so dass anschließend ein intensiveres histochemisches Signal sichtbar gemacht werden kann. Die eingebauten Biotin- bzw. Digoxigeninmoleküle können auch durch Kopplung von Avidin- bzw. Antidigoxigenin-Antikörpern an

Fluoreszein ohne einen weiteren Zwischenschritt (indirekte Methode mit Farbreaktion) in einer Fluoreszenzoptik sichtbar gemacht werden.

Als Positivkontrolle kann bei der TUNEL-Methode Thymus (ANSARI et al., 1993), Hoden, in Rückbildung begriffenes Mammagewebe (LABAT-MOLEUR et al., 1998) oder Darm herangezogen werden (GAVRIELI et al., 1992; CONSTAN et al., 1996; SHORT et al., 1997), da in diesen Organen sehr hohe Apoptoseraten zu erwarten sind.

Durch Beladung von Goldpartikeln mit Nukleotiden wird ein Einsatz der terminalen Transferase in der Elektronenmikroskopie ermöglicht. Dies kann der Klärung der vielfach diskutierten Frage, ob die TUNEL-positiven, lichtmikroskopisch unveränderten Zellen frühe Stadien der Apoptose darstellen, dienen (VALENTE et al., 1998). Bei Bedarf kann durch eine simultane Markierung zellspezifischer Antigene immunzytologisch die Subpopulation der betroffenen Zellen identifiziert werden (GOLD et al., 1993).

Eine Unterbrechung der kontinuierlichen Chromatinstruktur kann aber auch auf anderen biologischen Ursachen als der Apoptose beruhen und falsch-positive Ergebnisse bedingen: Neben der bereits genannten Nekrose spielen RNS-Synthese, DNS-Replikation, DNS-Defekte, Genomreparatur, Autolyse und auch Ca^{2+} -enthaltende Vesikel eine Rolle (ANSARI et al., 1993; GORCZYCA et al., 1993b; WIJSMAN et al., 1993; GRASL-KRAUPP et al., 1995; KONG und RINGER, 1995; NAKAMURA et al., 1995; NEGOESCU et al., 1996; DONG et al., 1997; SHORT et al., 1997; WRONE-SMITH et al., 1997; KOCKX et al., 1998; LABAT-MOLEUR et al., 1998). Ebenso können bei der Herstellung von immunhistologischen Schnitten auch nach der Probenentnahme DNS-Bruchstücke auftreten: z.B. bei der Fixation, während der Paraffineinbettung, beim Schneiden der Gewebeschnitte oder durch die Vorbehandlung, z.B. mit Proteinase K oder Salzsäure (GORCZYCA et al., 1993b; WIJSMAN et al., 1993; NEGOESCU et al., 1996; SHORT et al., 1997; LABAT-MOLEUR et al., 1998; SLOOP et al., 1999). Auch YANG et al. (1998) stellten fest, dass in einem Teil von Gehirngewebeproben, die verzögert fixiert wurden, zahlreiche Zellen ohne apoptotische Morphologie mit der TUNEL-Methode markiert wurden. Diese Arbeitsgruppe konnte nicht klären, ob diese Beobachtung auf unübliche ante mortem oder post mortem Konditionen, auf Nekrose oder auf persistierenden Artefakten beruht. Eine Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle bewirkte eine 30-fache Sensitivitätssteigerung. Korrespondierend tritt allerdings eine Verringerung der Spezifität in Rattenlebern in Erscheinung, so dass vermehrt Zellen ohne apoptotisches Erscheinungsbild markiert werden (NEGOESCU et al., 1996; SHORT et al., 1997; LABAT-MOLEUR et al., 1998). Hieraus und aus der Feststellung, dass aus gleicher Vorbehandlung und Färbetechnik bei verschiedenen Geweben und Zelltypen voneinander abweichende Resultate zustande kommen können, wird ersichtlich, dass das Färbe-

protokoll an die Versuchsmodelle angepasst werden muss (NEGOESCU et al., 1996; LABAT-MOLEUR et al., 1998).

Der Zeitpunkt des Eintretens der DNS-Fragmentierung im Verlauf des Apoptoseprozesses wird in den Publikationen widersprüchlich beschrieben. Lichtmikroskopisch sind Apoptosen nur für etwa drei bis vier (BURSCH et al., 1992; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b) bzw. vier bis neun Stunden (ARENDS und WYLLIE, 1991) erkennbar. Mit Hilfe der TUNEL-Methode sollen Apoptosestadien noch vor histologischer Erkennung erfasst werden, wodurch die Zeitspanne der Registrierbarkeit vergrößert wird (GORCZYCA et al., 1993b; KONG und RINGER, 1995; DONG et al., 1997; OYAIZU et al., 1997; ZHAO et al., 1997). Demgegenüber konnten COLLINS et al. (1997) apoptotische Zellen mit dieser Methode erst kurz vor der Lyse und WHEELDON et al. (1995) erst zwei Stunden vor dem Zusammenbruch der Plasmamembran markieren.

Bei Einsatz der TUNEL-Methode sollen apoptotische Zellen dennoch früher als die ebenfalls positiven Nekrosen detektiert werden (GRASL-KRAUPP et al., 1995). Als problematisch erwies sich hierbei, dass die Zellen einer Zellpopulation nach Induktion nicht gleichzeitig den Apoptoseprozess beginnen und teilweise auch ein Ausbleiben bzw. nur ein partielles oder spätes Auftreten der Fragmentierung beobachtet wurde (COLLINS et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1992a, b; ORMEROD et al., 1994; DOUGLAS et al., 1995; GRASL-KRAUPP et al., 1995; COLLINS et al., 1997). Aus all diesem ergibt sich, dass eine eindeutige Differenzierung der beiden Formen des Zelltodes unter dem zeitlichen Gesichtspunkt der DNS-Fragmentierung nicht erfolgen kann (GOLD et al., 1993; GRASL-KRAUPP et al., 1995).

2.7.5. Durchflusszytometrie

Merkmale, die zur Differenzierung apoptotischer von normalen oder nekrotischen Zellen in der Durchflusszytometrie genutzt werden können, sind die reduzierte Größe, die abnehmende Markierbarkeit mit DNS-Fluorochromen (z.B. Propidiumjodid, Akridinorange), eine verminderte Plasmamembranintegrität, Veränderungen der Membranrezeptoren, Unterschiede des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie Veränderungen der lysosomalen Aktivität (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; GOLD et al., 1993; ALISON und SARRAF, 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Desweiteren können mit dieser Methode molekulare und biochemische Mechanismen der Apoptose wie z. B. die Reaktionskaskade (siehe Kap. 2.2.) studiert werden (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; GOLDSWORTHY et al., 1996a).

Die Untersuchungen können ohne erheblichen Mehraufwand an Zellsuspensionen (Zellkulturen und Blutzellen) durchgeführt werden, dagegen erfordert die durchfluss-

zytometrische Quantifizierung der apoptotischen Zellen z.B. in der Leber eine vorherige Kollagenase-Perfusion mit nachfolgender Zellisolierung (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b).

2.7.6. Annexin-Fluoreszein-Isothiozyanat und Propidiumjodid

Das anionische Phospholipid Phosphatidylserin (PS) ist zu etwa 95% in der zytosolischen Schicht der Doppelmembran der äußeren Zellmembran lokalisiert. Mit der Einleitung des programmierten Zelltodes kommt es durch noch nicht genau geklärte Reaktionsmechanismen zu einer Umverteilung dieses Membranbausteins an die Außenseite der Plasmamembran (DIAZ und SCHROIT, 1996; VAN DEN EIJNDE et al., 1997a, b; VAN ENGELAND et al., 1998). Auch bei Insekten- und Pflanzenzellen kann dieser Wechsel der Lokalisation des PS beobachtet werden (VAN ENGELAND et al., 1998). Nur durch die hauptsächliche Orientierung des Phosphatidylserins zur Zellumgebung ist eine Verschmelzung der Membranabschnürungen und die Bildung apoptotischer Körperchen möglich (DIAZ und SCHROIT, 1996). Phosphatidylserin fungiert gleichfalls als Rezeptor für die Phagozyten – speziell für Makrophagen aus der Peritonealhöhle. Durch die schnelle Phagozytose wird ein Austritt chemotaktischer Substanzen mit nachfolgender entzündlicher Reaktion verhindert (DIAZ und SCHROIT, 1996; VAN DEN EIJNDE et al., 1997a, b).

Eine Sichtbarmachung des nach außen verlegten PS wird durch die Anlagerung des Antikoagulans Annexin V (Synonyme: "Placental Protein 4" (PP4), "Vascular-Anticoagulant- α ") ermöglicht, welches an Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) oder Biotin gekoppelt ist, wodurch der direkte oder indirekte Nachweis möglich wird (KOOPMAN et al., 1994; VAN ENGELAND et al., 1998).

Da bei der Nekrose ein Verlust der Plasmamembranintegrität innerhalb weniger Minuten eintritt, resultiert bei diesen Zellen eine Farbreaktion an der Membraninnenseite. Eine Zusatzfärbung mit Vitalfarbstoffen (z.B. Propidiumjodid) bietet eine zusätzliche Unterscheidungsmöglichkeit der Annexin-positiven Zellen, da bei apoptotischen Zellen die Vitalfarbstoffe nicht durch die langfristig unversehrte Membran eindringen können. Bei nekrotischen Zellen wird dagegen der Zellkern angefärbt. Lebende unveränderte Zellen weisen weder die eine, noch die andere Markierung auf (KOOPMAN et al., 1994; MARTIN et al., 1995; VERMES et al., 1995; VAN ENGELAND et al., 1998). Phosphatidylserin ist auch bei der physiologischen Fusion von Myo- und Kardiomyoblasten (Synzytienbildung der Myotuben bzw. Herzmuskelzellen) vermehrt an der Außenseite der Plasmamembran nachweisbar (VAN DEN EIJNDE et al., 1997a, b).

Ein Vorteil dieser leicht durchführbaren Nachweismethode ist, dass die Verlagerung von Phosphatidylserin frühzeitig während der Apoptose stattfindet, wenn sonst noch keine bzw. nur sehr feine Abweichungen von der normalen Zellmorphologie zu erkennen sind (MARTIN et al., 1995; VERMES et al., 1995; VAN DEN EIJNDE et al., 1997b; VAN ENGELAND et al., 1998). Die internukleosomale Degradierung der DNS setzt gleichfalls später ein, weshalb einige Zellen Annexin-positiv sind bevor Strangbrüche der DNS mit der TUNEL-Methode aufgezeigt werden können (VAN ENGELAND et al., 1998).

Neben dem Einsatz in der Durchflusszytometrie wurden durch Injektion des Annexin V in Mäuseembryonen Apoptosen im kompletten Tierkörper markiert und am Gewebeschnitt sichtbar gemacht. Nachteile hierbei sind die Toxizität der Substanz, so dass eine Markierung nur kurz vor dem Tod erfolgen kann, sowie die fehlende Einsatzmöglichkeit an archiviertem Nassmaterial. Weiterhin werden nur diejenigen apoptotischen Zellen und Körperchen markiert, die dem im Blut zirkulierenden Annexin V zum Zeitpunkt der Injektion zugänglich waren. Intrazelluläre Fragmente sind folglich nur positiv, wenn sie erst nach der Kopplung von Annexin phagozytiert wurden (VAN DEN EIJNDE et al., 1997a, b).

2.7.7. Wachstumsfaktoren, Gene und Proteine

Weitere Methoden zur Identifizierung der Apoptosen in der Leber basieren z. B. auf der Darstellung verschiedener Wachstumsfaktoren. Einer der wichtigsten aus dieser Gruppe ist der Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), der vermutlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine aktive Funktion im Rahmen der Leberzellapoptose (siehe Kap. 2.2.6.) besitzt (BURSCH et al., 1984; 1990; OBERHAMMER et al., 1991; 1992a, b). Hepatozyten, die sich auf die Apoptose vorbereiten (präapoptotische Zellen) oder die Apoptose bereits durchlaufen, zeigen positive Immunmarkierung für TGF- β_1 (das eigentliche Effektormolekül) und stärkere noch für TGF- β -“latent associated protein” (TGF- β -LAP) (BURSCH et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1992a, b). Der Nachweis von TGF- β -LAP gelingt bereits drei Stunden bevor die apoptotische Chromatinkondensation an der Kernmembran beginnt (BURSCH et al., 1993). Auch die Endothelzellen, welche die Leberzellbalken begrenzen, werden markiert (BURSCH et al., 1993). Dies korreliert mit dem Ort der Genexpression von TGF- β_1 (NAKATSUKASA et al., 1990; JIRTLE und MEYER, 1991). Die morphologisch noch nicht erkennbaren präapoptotischen Leberzellen weisen bei dem Nachweis von TGF- β -LAP zwei verschiedene Färbetypen auf. Eine granuläre Markierung steht einer eher homogenen Färbung gegenüber. Es konnte noch nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um zwei verschiedene Stadien der Apoptose handelt. Unklar ist zu-

dem, ob die Markierung einer Zelle den irreversiblen Eintritt in den Apoptoseprozess bedeutet (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Eine Erklärung für die Akkumulation von TGF- β -LAP in den Zellen - ebenso wie in den resultierenden apoptotischen Körperchen (AB) - kann in der Halbwertszeit von zwei Stunden gesehen werden. TGF- β_1 wird dagegen schon in zwei Minuten degradiert und ist somit nur kurzfristig nachweisbar (WAKEFIELD et al., 1990; MILLS et al., 1995). Eine Analyse der morphologisch unveränderten, potentiell präapoptotischen Zellen zeigt eine Korrelation zwischen der Prävalenz dieser positiven Zellen und dem Auftreten von AB. Zusätzlich sind die markierten Zellen etwa 15% kleiner als die TGF- β_1 -negativen Zellen, was mit der Schrumpfung apoptotischer Zellen in Zusammenhang stehen könnte (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1993). Apoptotische Körperchen weisen zu 70% eine Markierung durch TGF- β -LAP auf (BURSCH et al., 1993). Die ausbleibende Färbung der übrigen AB könnte auf der fortgeschrittenen Degradierung in späteren Apoptosestadien beruhen (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1990). Diese Methode kann folglich eingesetzt werden, um apoptotische Leberzellen zu identifizieren, die lichtmikroskopisch anhand ihrer Morphologie noch nicht erkannt werden (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Nekrotische Zellen weisen keine Markierung auf (BURSCH et al., 1993).

Weiterhin kann der Vitronektin-Rezeptor zum Nachweis von Apoptosen herangezogen werden. Dieser Rezeptor ist ein Membranprotein und Mitglied der Integrin-Rezeptor-Familie, über den Makrophagen neben Phosphatidylserin (DIAZ und SCHROIT, 1996; VAN DEN EIJNDE et al., 1997a, b) apoptotische Zellen erkennen (SAVILL et al., 1990). Hinweise auf die Bereitschaft zur oder Resistenz gegenüber Apoptose können ferner durch bestimmte Genprodukte wie z.B. p53, c-myc, Fas, bcl₂ und Interleukin 1 β converting-Enzym (ICE, Kaspase 1), die in der Regulation der Apoptose involviert sind, erhalten werden (siehe auch Kap. 2.2.). Proteinprodukte von p53, c-myc, Fas und bcl₂ beeinflussen verschiedene Phasen des Prozesses, sind entweder apoptosehemmend (z.B. bcl₂), apoptosefördernd (z.B. p53) oder agieren abhängig von weiteren Faktoren (z.B. c-myc). Sie können in einer komplexen Art interagieren (HARRINGTON et al., 1994; DUKE et al., 1997). Obwohl diese Gene und deren Genprodukte in Gewebeschnitten nachgewiesen werden können, ist ihre Nutzbarkeit als genereller Marker der Apoptose beschränkt, da sie zum Teil nur sehr kurzfristig exprimiert werden. Weiterhin ist ihre Expression in verschiedenen Zelltypen und Geweben unterschiedlich und somit nicht in jedem Fall spezifisch für den apoptotischen Prozess (GOLDSWORTHY et al., 1996b).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für diesen Versuch wurden 20 weibliche, 35 Tage alte Chbb.THOM (SPF) Wistar-Ratten der Boehringer Ingelheim Pharma KG eingesetzt. Die Tiere wurden einzeln in Drahtkäfigen des Typs DK III (Firma Becker&Co, Castrop-Rauxel) gehalten. In einer 14-tägigen Adaptationsphase wurden die Ratten auf einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus eingestellt: 12 Stunden Licht von 21⁰⁰-9⁰⁰ Uhr, Dunkelheit von 9⁰⁰-21⁰⁰ Uhr. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 30-70% und die Raumtemperatur betrug 20-24°C. Das Futter (Kliba-Haltungsdiät Ratte/Maus/Hamster, Mehl der Firma Klingentalmühle AG, Schweiz) wurde über fünf Stunden von 9⁰⁰-14⁰⁰ Uhr ad libitum verabreicht. Trinkwasser wurde über 24 Stunden ad libitum gereicht. Die Tiere wurden in einem Alter von 49 Tagen in den Versuch genommen.

3.2. Behandlung und Tötung der Versuchstiere

In Anlehnung an die Veröffentlichungen von AGARWAL und MEHENDALE (1983) und BURSCH et al. (1985; 1986) wurde der Versuch wie folgt durchgeführt (Abb. 3):

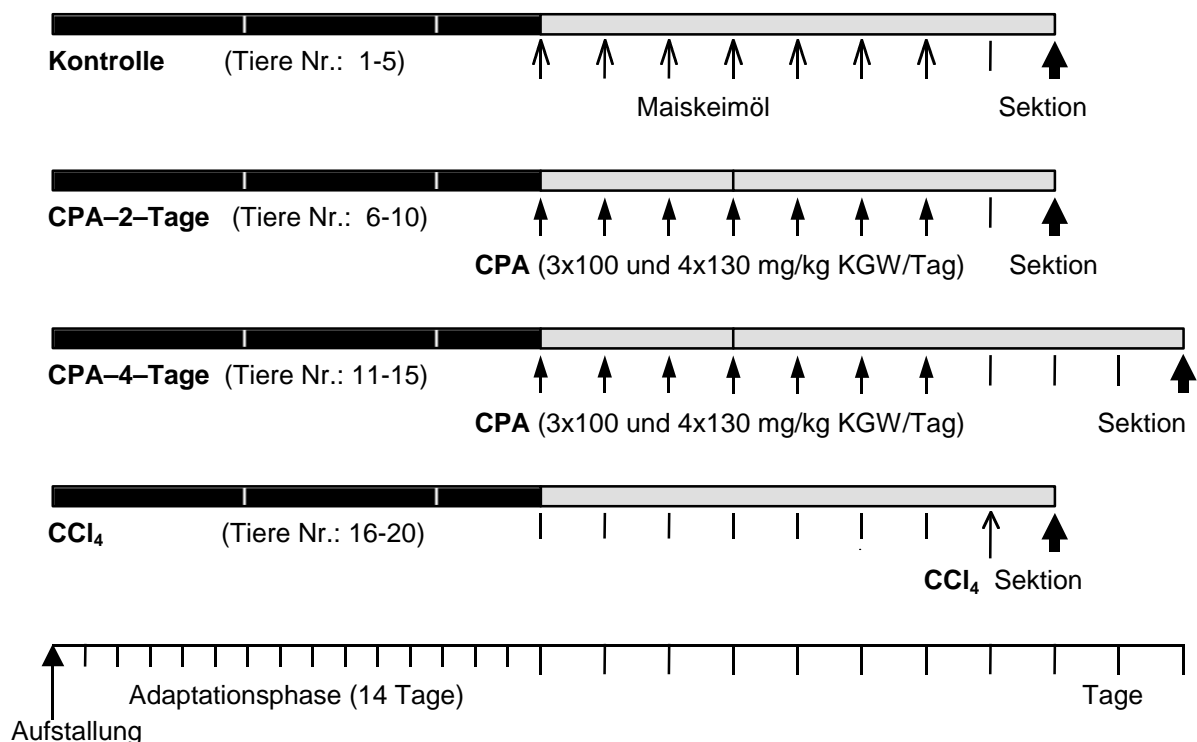


Abb. 3: Experimentelles Protokoll. Die Details sind dem Text zu entnehmen.

CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - Versuchsgruppe, die zwei Tage nach der letzten CPA-Applikation getötet wurde; CPA-4-Tage - Versuchsgruppe, die vier Tage nach der letzten CPA-Applikation getötet wurde; CCl₄ - Tetrachlorkohlenstoff; I - ohne Behandlung.

a) Kontrolle:

Über sieben Tage erhielten fünf Kontrolltiere einmal täglich 10 ml/kg Körpergewicht (KGW) Maiskeimöl (DAB 1986, 6. Erg. 1994) per Magenschlundsonde. Zwei Tage nach der letzten Verabreichung wurden sie im Alter von 57 Tagen am Ende der Lichtphase getötet und seziiert.

b) Cyproteronacetat (CPA):

Mit dem Ziel Apoptosen in der Leber zu induzieren, wurde als erster Schritt bei zehn Tieren durch mehrmalige Applikation des Lebermitogens Cyproteronacetat (CPA; Schering AG, Berlin) eine hepatozelluläre Hyperplasie hervorgerufen. Die Dosis lag bei 100 mg/kg KGW/Tag per Magenschlundsonde an drei aufeinanderfolgenden Tagen, danach täglich je 130 mg/kg KGW/Tag über vier Tage. Die Dosierung von CPA wurde nach drei Tagen erhöht, um die Wachstumsreaktion der Leber zu verstärken (BURSCH, 1999, persönliche Mitteilung). Zusätzlich wurde die Substanz in einer Konzentration von 1% bzw. 1,3% in Maiskeimöl gelöst, um eine konstante Dosis Öl (10 ml/kg) pro Applikation zuzuführen.

Als provozierte Gegenreaktion auf die erhöhte Proliferation wurde in einem zweiten Schritt durch Absetzen von CPA die Apoptoserate erhöht. Sowohl die periodische Fütterung als auch der veränderte Tag-Nacht-Rhythmus dienten der partiellen Synchronisation der Apoptosen. Zu diesem Zweck wurden jeweils fünf Ratten an dem zu erwartenden Peak der Apoptose zwei Tage nach der letzten Dosis (CPA-2-Tage) sowie weitere zwei Tage später (CPA-4-Tage) am Ende der Lichtphase getötet (BURSCH et al., 1984; 1985; LAUER, 1985; BURSCH et al., 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; ROBERTS et al., 1995).

c) Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄):

Für die Induktion von Leberzellnekrosen wurde fünf Tieren im Alter von 56 Tagen einmalig 0,1 ml/kg KGW Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄; Riedel-de Haen) in 0,9 ml/kg KGW Maiskeimöl i.p. appliziert. Die Sektion erfolgte 24 Stunden später. Um eine Schadstoffbelastung der Sekanten zu vermeiden, wurde diese unter dem Abzug durchgeführt.

Sämtliche Ratten wurden in der Zeit von 8⁰⁰ bis 9⁰⁰ Uhr unter CO₂-Narkose dekapiert und entblutet. Die Tiere der Kontroll-, der CPA-2-Tage-Gruppe sowie der CCl₄-Gruppe waren zu diesem Zeitpunkt 57 Tage, die der CPA-4-Tage-Gruppe 59 Tage alt.

3.3. Histologische Methoden

3.3.1. Probenentnahme/-fixierung

Während der Sektion wurde der Lobus sinister lateralis der Leber in 17 etwa gleich große, 2-3 mm dicke Scheiben getrimmt. Die Leberproben wurden umgehend jeweils in einer Kassette (Leica Instruments GmbH, Seelze) bei Raumtemperatur nach dem Schema in Tab. 8 fixiert. Es wurde immer derselbe Lappen aufgearbeitet, um eventuelle Unterschiede der Apoptosehäufigkeiten in den verschiedenen Leberlappen, wie es bei der Erhebung von Labeling-Indizes beobachtet wurde (JONES et al., 1993), zu vermeiden. Da gleichartige Beobachtungen auch für Apoptose-Indizes angedeutet wurden (GOLDSWORTHY et al., 1996b), sollten derartige mögliche Unterschiede bei der Auswahl eines geeigneten Nachweissystems für die Apoptose vermieden werden.

Tab. 8: Fixierungsschema der Leberscheiben jeweils eines Tieres

Fixierung	Fixierungszeit (in Tagen)				Bezeichnung im weiteren Text
Formaldehyd (4%ig, pH 7,4)	1	28	92		reine Formaldehyd-Fixierung
1 Tag Formaldehyd, anschließend Aufbewahrung in 70%igem Ethanol	3,5	28	92		1 Tag Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung)
Carnoysches Gemisch	1	7	28	92	Carnoy-Fixierung

Carnoysches Gemisch: Zusammensetzung siehe Anhang.

3.3.2. Einbettung der Organe

Die nur im gepufferten, 4%igen Formaldehyd fixierten Leberproben wurden 30 Minuten in fließendem Leitungswasser gewässert. Zusammen mit den nach der eintägigen Formaldehyd-Fixierung in Alkohol aufbewahrten Gewebeproben wurden sie in einem 19-Stunden-Programm (siehe Kap. 8.5.1.) in einem Paraffinierungsgerät (2 l Processor MK II, Shandon, Frankfurt) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) sowie in Xylol bei Raumtemperatur entwässert und entfettet. Das in Carnoy fixierte Organmaterial wurde gesondert in einem Zeitraum von elf Stunden (siehe Kap. 8.5.1.) im Paraffinierungsgerät in 100%igem Ethanol und in Xylol entwässert und entfettet.

Sämtliche Organe wurden im Einbettautomaten (EG 1160 Leica, Lorsch) in Paraplast bei 58°C (Merck, Darmstadt) eingebettet.

3.3.3. Herstellung der histologischen Präparate

Von den auf einer Kühlplatte gekühlten Paraplast-Blöcken (-2°C) wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 355, Walldorf) und Einmalmessern (Microtom Blades S35, Feather) 3-4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die nach Streckung in einem 43°C warmen Wasserbad auf Objektträger (StarFrost, PSI, Laudenbach) aufgezogen wurden. Für die verschiedenen Untersuchungen wurden Serienschnitte verwandt.

Um ein Abschwimmen der Organproben zu vermeiden, wurden die Schnitte für die H&E-Färbungen (Standard- und alkoholische H&E) über 24 Stunden bei 60°C im Trockenschrank und für die TUNEL-Methode 48 Stunden bei Raumtemperatur vollständig getrocknet.

Für die histologische Auswertung der Apoptose-Indizes im Standard-Lichtmikroskop erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin/wässrigem Eosin (Standard-H&E, im Färbeautomat: Medite COT 20) und mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, AP (TUNEL, Boehringer, Mannheim). Die Darstellung der apoptotischen Körperchen anhand ihrer Eosinfluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop wurde durch die Färbung mit Hämatoxylin/alkoholisches Eosin (alkoholische H&E) ermöglicht.

Bei dem Apoptosenachweis mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, AP (TUNEL-Methode - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; Boehringer, Mannheim) wurde bei jedem Färbedurchlauf eine Negativkontrolle mitgeführt, die entsprechend den Herstellerangaben statt mit dem TUNEL-Reaktionsgemisch nur mit der Label-Lösung inkubiert wurde (siehe Kap. 3.3.3.2.).

Die Nachweismethoden wurden wie folgt bei den verschiedenen Leberproben angewandt:

Tab. 9: Angewandte Färbemethoden auf den unterschiedlich fixierten Gewebeschnitten.

Fixierungsmittel	Färbemethode		
	Standard-H&E	TUNEL	alkoholische H&E
reines Formaldehyd	X	X	n.d.
1 Tag Formaldehyd mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol	X	X	n.d.
Carnoy	n.d.	n.d.	X

X - durchgeführt, n.d. - nicht durchgeführt.

3.3.3.1. Wässrige Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Standard-H&E)

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (1 x 5 und 2 x 0,5 Minuten). Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (1 Minute in 100% und je 0,5 Minuten in 100%, 96% und 70% Ethanol). Kurz in Aqua dest. spülen.
- 2) 5 Minuten in Hämatoxylin nach Ehrlich (sauer) färben.
- 3) 5 Sekunden zum Bläuen der Kerne in fließendes Leitungswasser eintauchen.
- 4) 5 Sekunden in 0,5%igem Salzsäure-Ethanol (70% Ethanol) differenzieren.
- 5) 1 Minute in wässriger Eosinlösung gegenfärben.
- 6) 5 Sekunden in 1%iger Essigsäure differenzieren.
- 7) In einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren (2 x 1 Minute in 96% Ethanol, 3 x 1 Minute in 100% Ethanol) und anschließend in Xylol überführen.
- 8) Eindecken der Präparate mit Pertex (Medite, Burgdorf) im Eindeckautomaten Promounter RCM 90.

3.3.3.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2 x 5 Minuten). Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100%, 100%, 96% und 70% Ethanol). Kurz in Aqua bidest. spülen.
- 2) Einengung des Pipettierungsfeldes mit dem Pap-Pen (BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA), um ein Abfließen der nachfolgenden Lösungen zu verhindern.
- 3) 25 Minuten bei Raumtemperatur (37°C) mit Protease von *Streptomyces griseus* inkubieren (20 µg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4-8,0, Molecular Sigma Biology).
- 4) 2 x in PBS (0,1 M, pH 7,8, BioGenex) waschen.
- 5) 60 Minuten bei 37°C mit 100 µl TUNEL-Reaktionsgemisch in einer feuchten Kammer inkubieren.
(Das Gemisch wird kurz vor Gebrauch aus den beiden Stammlösungen
a) Enzymlösung: terminale Deoxynucleotidyl-Transferase aus Kälberthymus in Aufbewahrungspuffer und
b) Labellösung: Nukleotidmischung in Reaktionspuffer nach Anleitung im Verhältnis 1:10 hergestellt).
- 6) 3 x in PBS (0,1 M, pH 7,8, BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA) waschen.
- 7) 30 Minuten bei 37°C mit 100 µl Converter-AP (Anti-Fluoreszein-AK konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP), ready to use) in einer feuchten Kammer inkubieren.

- 8) 3 x in PBS (0,1 M, pH 7,8, BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA) waschen.
- 9) Auftropfen von 200 µl des frisch angesetzten chromogenen Substrats Fast Red (BioGenex).
- 10) Sobald eine ausreichende Farbreaktion eingetreten ist (ca. 4 Minuten) mit PBS (0,1 M, pH 7,8, BioGenex) spülen.
- 11) 3 Minuten in Hämalun nach Mayer (sauer) färben.
- 12) 3 Minuten zum Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser spülen.
- 13) Eindecken der Präparate mit erwärmter (45°C Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).
- 14) Einrahmen der Präparate mit Pertex (Medite, Burgdorf).

Zum Schutz vor dem Austrocknen wurden nach den Schritten 5) und 7) Deckgläser auf die Schnitte gelegt, die nach Ablauf der Reaktionszeit vorsichtig mit PBS abgespült wurden.

Die Negativkontrollen wurden in Schritt 5) ausschließlich mit 100 µl der Labellösung (b) inkubiert.

Als Positivkontrolle wurde zum Zeitpunkt der Involution (am Ende der Laktation) entnommenes Mammarydrüsengewebe von Ratten mitgeführt (LABAT-MOLEUR et al., 1998).

Angelehnt an das Färbeprotokoll des Herstellers wurde zunächst in Vorversuchen getestet, ob bei der TUNEL-Methode die Vorbehandlung der Schnitte mit Levamisol sowie verschiedene Proteasekonzentrationen bessere Färbeergebnisse liefern. Überprüft wurde Levamisol in einer Konzentration von 5% für 20 und 40 Minuten sowie Protease von *Streptomyces griseus* in einer Konzentration von 0, 20 und 40 µg/ml.

3.3.3.3. Alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (alkoholische H&E)

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (1 x 5 Minuten und 2 x 0,5 Minuten). Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (1 Minute in 100%igem Ethanol und je 0,5 Minuten in 100%, 96% und 70% Ethanol). Kurz in Aqua dest. spülen.
- 2) 5 Minuten in Hämatoxylin nach Ehrlich (sauer) färben.
- 3) 5 Sekunden zum Bläuen der Kerne in fließendes Leitungswasser eintauchen.
- 4) 2 Minuten in Aqua bidest. spülen.
- 5) 2 Minuten in 50%igem Ethanol differenzieren.
- 6) 3 Minuten in 0,4%iger alkoholischer (60% Ethanol) Eosinlösung gegenfärben.
- 7) In einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren (20 Sekunden in 80%, 1 Minute in 96% und 2 Minuten in 100% Ethanol) und anschließend in Xylol überführen.
- 8) Eindecken der Präparate mit Pertex im Eindeckautomaten Promounter RCM 90

Für die Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Apoptosen anhand der Eosin-fluoreszenz wurde ein Vorversuch mit verschiedenen Konzentrationen der unter 6) eingesetzten alkoholischen Eosinlösung durchgeführt. Dies diente zur Überprüfung, ob auch unter diesem Versuchsregime die von STINCHCOMBE (1996) beschriebenen optimalen Resultate in der Fluoreszenz apoptotischer Körperchen bei Verwendung einer 0,4%igen Eosinlösung erreicht werden. Getestet wurden die Konzentrationen 0,3%, 0,4% und 1%.

3.3.3.4. Fett- und Glykogendarstellung

Zur qualitativen Darstellung von Leberfett und -glykogen der CPA-behandelten Tiere wurde an jeweils einem Probeschnitt eine Oil-Red-O-Färbung (ORO) bzw. eine Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) durchgeführt.

Oil-Red-O-Färbung (Gefrierschnitte):

- 1) Schnitte etwa 30 Minuten nach dem Schneiden auf dem Objektträger bei Raumtemperatur antrocknen lassen.
- 2) 3 Sekunden in Aqua dest. eintauchen.
- 3) 5 Minuten in 60%igem Isopropanol entwässern.
- 4) 10-12 Minuten in Oil-Red-O-Gebrauchslösung färben.
- 5) Durch 2-3-maliges Eintauchen in 60%igem Isopropanol differenzieren.
- 6) 3 Sekunden in Aqua dest. eintauchen.
- 7) 3 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer färben.
- 8) 10 Minuten zum Bläuen der Kerne in fließendes Leitungswasser eintauchen.
- 9) Eindecken der Präparate mit erwärmter (45°C) Kaisers Glycingelatine.
- 10) Einrahmen der Präparate mit Pertex.

PAS-Färbung:

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (1 x 5 und 2 x 0,5 Minuten). Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (1 Minute in 100% und je 0,5 Minuten in 100%, 96% und 70% Ethanol). Kurz in Aqua dest. spülen.
- 2) 5 Minuten in alkoholischer Perjodsäure (siehe Anhang) färben.
- 3) 5 Minuten in fließendem Leitungswasser wässern und anschließend in Aqua dest. spülen.
- 4) 20 Minuten im Schiffschen Reagens (siehe Anhang) färben.
- 5) 5 Minuten in fließendem Leitungswasser wässern und anschließend in Aqua dest. spülen.
- 6) 30 Minuten in fließendem Leitungswasser wässern.
- 7) 1-3 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer färben.

- 8) 5-10 Minuten zum Bläuen der Kerne in fließendes Leitungswasser eintauchen.
- 9) In einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren (2 x 1 Minute in 96%, 3 x 1 Minute in 100% Ethanol) und anschließend in Xylol überführen.
- 10) Eindecken der Präparate mit Pertex.

3.4. Auswertungsstrategien

3.4.1. Hilfsmittel zur Auswertung

Die Quantifizierung der apoptotischen und nekrotischen Zellen und Körperchen im Standard-Lichtmikroskop (Leitz, Orthoplan, Lorsch) erfolgte manuell bei einer Vergrößerung von 10 (Okular) x 40 (Objektiv), also insgesamt bei 400-facher Vergrößerung.

Für die Überprüfung der Eigenfluoreszenz wurde dieses Mikroskop für die Fluoreszenzmikroskopie zusätzlich mit einem Filter: I2 (BP 530-560, RKP 580, LP 580-grüne Fluoreszenz) ausgestattet. Hierbei wurde mit der Auflichtmethode gearbeitet.

Sowohl im Standard-Licht- als auch im Fluoreszenzmikroskop wurde in den Strahlengang zur Gewährleistung einer kontrollierten Auswertung ein Rahmen eingesetzt. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines rechnergestützten Bildanalysegerätes (Leica Q500MC bestehend aus einem Lichtmikroskop (Leica DM RBE), einer Videokamera (Sony, DXC-930P) und einem Rechner) die automatisierte Auswertung der Präparate (TUNEL-Methode und Standard-H&E-Färbung) getestet. Diese Auswertungsstrategie wurde aber aufgrund mangelhafter Ergebnisse vor allem bei der Standard-H&E-Färbung wieder verworfen.

3.4.2. Auswahl der Messfelder

Zur Ermittlung der Apoptose- und Nekrose-Indizes (siehe Kap. 3.4.3.) wurden jeweils 15 000 Hepatozyten pro Schnitt ausgezählt.

Nach Bestimmung der durchschnittlichen Zellzahl in dem eingelegten Rahmen wurden am Rand jedes Leberschnittes drei Ausgangspunkte festgelegt, zwei äußere und ein mittlerer. Von diesen Punkten ausgehend erfolgte senkrecht zum größten Querdurchmesser der Leberschnitte eine meanderförmige Auswertung jeweils bis zur gegenüberliegenden Seite. Dies wurde wiederholt bis Apoptosen und Nekrosen bei jeweils 5 000 Leberzellen quantitativ erfasst waren. Um die teilweise auftretende unspezifische Anfärbung an den Probenrändern bei der TUNEL-Methode zu umgehen, wurde die Auswertung jeweils im Abstand von zwei Zählrahmen vom Organrand begonnen bzw. beendet. Bei den Serienschnitten für die TUNEL-Methode und die Standard-H&E-Färbung wurden identische Anfangspunkte ausgewählt.

Bei der Auswertung erfolgte die endgültige Identifizierung der Apoptose nach morphologischen Kriterien. Das frühe Apoptosestadium mit sichelförmig an der Kernmembran kondensiertem Chromatin (apoptotische Zelle) sowie die resultierenden apoptotischen Körperchen (mit oder ohne Chromatin) wurden differenziert. Bei der TUNEL-Methode erfolgte neben einer Differenzierung von apoptotischen Zellen und Körperchen eine Auftrennung nach Färbeintensität (siehe Kap. 3.4.4.-3.4.6.).

Bei der Ermittlung der nekrotischen Zellen erfolgte sowohl bei der Standard-Lichtmikroskopie als auch bei der Eosinfluoreszenz-Methode gleichfalls eine Unterteilung in chromatinhaltige und -lose Zellen (siehe Kap. 3.4.4. und 3.4.6.). Mittels der TUNEL-Methode wurden die nekrotischen Zellen mit einer zusätzlichen Anfärbung des Zytoplasmas von den rein granulär markierten Zellen differenziert (siehe Kap. 3.4.5.).

3.4.3. Apoptose- und Nekrose-Indizes

Apoptose- (AI) und Nekrose-Indizes (NI) wurden für alle Nachweissysteme folgendermaßen definiert:

$$AI (\%) = \frac{\text{gezählte Apoptosen}}{\text{gezählte Gesamtzellzahl}} \times 100$$

$$NI (\%) = \frac{\text{gezählte Nekrosen}}{\text{gezählte Gesamtzellzahl}} \times 100$$

3.4.4. Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Als apoptotische Zellen wurden geschrumpfte und aus dem Zellverband gelöste Hepatozyten angesprochen, welche eine sichelförmig an der Kernmembran haftende Chromatinkondensation sowie ein mehr oder minder deutlich eosinophileres Zytoplasma als die umgebenden unveränderten Hepatozyten aufwiesen.

Eine Unterscheidung der bereits apoptotisch fragmentierten Leberzellen, den apoptotischen Körperchen (AB), erfolgte in solche mit oder ohne Chromatinresten (siehe Abb. 20). Zudem wurden in Gruppen zusammen liegende AB tabellarisch als ein apoptotisches Ereignis aufgenommen, da der Ursprung aus einem Zelloriginal anzunehmen war (BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b; STINCHCOMBE, 1996). Einzeln liegende AB sowie jede Gruppe, in der mindestens ein AB mit Chromatinfragmenten enthalten war, wurde der Untergruppe der chromatinhaltigen apoptotischen Körperchen zugeordnet. Die Chromatinfragmente hoben

sich durch ihre basophile Anfärbung deutlich vom eosinophilen Zytoplasma ab. Bestand die Gruppe nur aus AB ohne sichtbare Chromatinreste, wurde sie in der Untergruppe der chromatinfreien Apoptosen aufgelistet. Einzeln vorliegende chromatinfreie AB wurden im Gegensatz zu den Chromatinhaltigen nur in die Berechnung mit einbezogen, wenn sie sich durch einen ungefärbten Hof ("Halo") und deutliche zytoplasmatische Eosinophilieverstärkung hervorhoben, um bei intrazellulärer Lage eine Verwechslung mit autophagischen Vakuolen zu vermeiden (BOLENDER und WEIBEL, 1973; BURSCH et al., 1985). Um möglichst alle Apoptosen zu erfassen wurden morphologisch eindeutige Apoptosen in jeder Größe erfasst. Dieses Zählprinzip erfolgte, um eine eventuelle Korrelation zwischen den AI der Standard-H&E-Methode und der TUNEL-Methode aufzuzeigen, da bei letzterer nur die AB mit DNS-Fragmenten erfasst werden (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b).

Die Leberproben der mit CCl₄ behandelten Tiere wurden so wie oben beschrieben auf das Vorkommen chromatinhaltiger bzw. -freier Nekrosen (basophil angefärbte Kernfragmente im Zytoplasma) untersucht. Im Gegensatz zu dem Apoptoseereignis lagen die nekrotischen Zellen nicht einzeln und verstreut, sondern zahlreich in einem breiten Ring um die abführenden Venen. Die geschwollenen, blass eosinophilen Zellen wurden jeweils als Einzelereignis gewertet. Zellfragmente mit einer geringeren Größe als der durchschnittliche Hepatozytenkern wurden nicht erfasst, da die Anzahl beteiligter Zellen nicht mehr erkannt werden konnten.

3.4.5. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Die mit der TUNEL-Methode angefärbten Schnitte wurden entsprechend der Standard-H&E-Schnitte im Standard-Lichtmikroskop ausgewertet, allerdings erfolgte hierbei methodisch bedingt (Markierung der DNS-Fragmente) keine Unterteilung in chromatinhaltige und -freie apoptotische Körperchen. Da bei der Auswertung einige schwach bis sehr schwach gefärbte apoptotische Ereignisse auffielen, wurden diese separat erfasst. Falsch negative apoptotische Ereignisse (ungefärbte, morphologisch eindeutige Apoptosen) und unerwünschte positive Zellanfärbung (markierte nicht-hepatozelluläre Zellen) sowie markierte morphologisch unveränderte Hepatozyten (siehe Abb. 21) wurden gesondert aufgelistet.

Die nekrotischen Zellen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Granulär markierte (keine Zytoplasmamarkierung) oder komplett angefärbte (intensive granuläre Markierung in Kombination mit schwacher, kompletter Zytoplasmamarkierung) Hepatozyten (siehe Abb. 23). Die ausschließliche Gegenfärbung mit Hämatoxylin erlaubte aufgrund der unscharfen Zellgrenzen die zusätzliche quantitative Erfassung der ungefärbten

nekrotischen Zellen nicht. Für die Berechnung des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Nekrosen wurden die Gesamtnekrosezahlen der korrespondierenden Standard-H&E-Schnitte herangezogen.

3.4.6. Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Nach Ermittlung der Apoptosen mit der Eosinfluoreszenz-Methode im Fluoreszenzmikroskop wurde anschließend eine morphologische Kontrolle durch Umschaltung auf Standard-Lichtmikroskopie durchgeführt. Einzelne oder in Gruppen liegende apoptotische Körperchen (AB) wurden getrennt aufgelistet, wenn sie kein fluoreszierendes Signal abgaben (falsch negativ). Konnten die Fluoreszenzsignale morphologisch nicht als Apoptosen angesprochen werden, wurden sie separat aufgelistet, aber nicht zur Berechnung der Apoptose-Indizes herangezogen.

Aufgrund der im Fluoreszenzmikroskop deutlich erkennbaren Plasmamembran war eine quantitative Erfassung der fluoreszierenden sowie der nicht-fluoreszierenden Nekrosen im Gegensatz zur TUNEL-Methode möglich. Aus der Gesamtnekrosezahl wurde der prozentuale Anteil der fluoreszierenden Nekrosen errechnet.

3.5. Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993) durchgeführt. Die graphischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0, (EISENSMITH, 1988) erzeugt.

Für die Beurteilung der Apoptose- und Nekrose-Indizes der Standard-H&E- und der alkoholischen H&E-gefärbten, die jeweils im Standard-Lichtmikroskop ermittelt wurden, sowie der TUNEL-gefärbten Schnitte wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren 'Tag' (Fixierungszeit) und 'Fixation' (Fixierungsmittel) mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Bei den Messparametern wurde separat für jede Versuchsgruppe überprüft, ob eine Beeinflussung durch die Fixierung der Gewebe (Fixierungsmittel bzw. Fixierungszeit), der Färbung der Schnitte und/oder eine Wechselwirkung zwischen diesen Faktoren bestand. Die Abwägung der Daten basierend auf der Eosinfluoreszenz erfolgte auf ähnliche Weise,

jedoch mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung im Faktor 'Tag', da bei dieser Methode der Einflussfaktor 'Fixierungsmittel' entfiel.

Eine mathematische Voraussetzung für die Anwendung dieser Verfahren war eine annähernde Normalverteilung der Einzelwerte innerhalb der Kombinationsgruppen aus Fixierung und Färbung. Da die prozentualen Werte der vorliegenden Studie eine rechtsschiefe Verteilungen aufwiesen, wurde durch logarithmische Transformation näherungsweise eine Normalverteilung herbeigeführt. Hierfür wurden die Nullwerte der Apoptose-Indizes durch den Wert der halben Nachweisgrenze (0,0035%) ersetzt. Die unterste Nachweisgrenze entsprach der Feststellung eines apoptotischen Ereignisses bei der Auswertung von 15 000 Hepatozyten pro Gewebeschnitt (0,007%). Im Anschluss an die Umrechnung wurden aus den fünf Einzelwerten der Kombinationsgruppen die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) berechnet. Zur Gewährleistung einer verständlicheren Interpretation der erhaltenen Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte anschließend durch Entlogarithmierung in den geometrischen Mittelwert (\bar{x}_g) überführt und graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde das 95%ige Vertrauensintervall der Mittelwerte wie folgt berechnet:

$$\bar{x} \pm t_{n-1; 0,95} * \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm t_{4; 0,95} * \frac{s}{\sqrt{5}} = \bar{x} \pm 2,776 * \frac{s}{\sqrt{5}} = \bar{x} \pm 1,2415 * s$$

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert von $\lg(x)$

n = Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe

$t_{n-1; 0,95}$ = Signifikanzschranken der Studentverteilung (SACHS, 1992: 2,776)

$n-1$ = Freiheitsgrade

0,95 = vorgewählte Aussagewahrscheinlichkeit

s = Standardabweichung von $\lg(x)$

Die dargestellten Vertrauensintervalle wurden durch Entlogarithmieren der oben genannten Vertrauensgrenzen errechnet.

Bei der Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

- $p \leq 0,001$: hoch signifikant
- $p \leq 0,01$: signifikant
- $p \leq 0,05$: schwach signifikant
- $p > 0,05$: nicht signifikant

Für die Apoptose-Indizes wurde zusätzlich bestimmt, um welchen Faktor der prozentuale Anteil der Apoptosen nach der Induktion dieses Ereignisses bezogen auf die Kontrolle jeweils angestiegen war (Anstiegsfaktor).

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst zuverlässige, wenig zeitaufwendige, kostengünstige und spezifische Methode für den Nachweis apoptotischer Zellen und Körperchen zu ermitteln. Es wurden drei gängige und im Routinebetrieb praktikierbare Methoden eingesetzt, die entweder durch morphologische Kriterien (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), durch den Nachweis von DNS-Fragmenten (TUNEL-Methode) oder durch die Eosinophilie der apoptotischen Körperchen (Eosinfluoreszenz) den Apoptosenachweis ermöglichen. Bei den beiden letztgenannten Methoden spielte die Morphologie im Zweifelsfall bei der Befundinterpretation ergänzend eine Rolle.

Zusätzlich sollten die Auswirkungen des Fixierungsmittels und der Fixierungszeit auf das Ergebnis der Apoptose-Indizes (AI) ermittelt werden. Die Auswertung der Apoptosen mittels der Standard-H&E-Färbung und der TUNEL-Methode wurde nach zwei verschiedenen Fixierungsmethoden (reine Formaldehyd-Fixierung, eintägige Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol) durchgeführt. An dem in Carnoy fixierten Material wurde die alkoholische H&E-Färbung zur Darstellung der Eosinfluoreszenz, mit anschließender morphologischer Kontrolle im Lichtmikroskop, angewandt. Es wurde eine kurze (1 Tag bzw. 3,5 Tage), eine mittlere (28 Tage) und eine lange (92 Tage) Fixierungszeit gewählt, da untersucht werden sollte, welche Nachweismethoden auch bei älterem Nassmaterial eingesetzt werden können. Da die Eosinfluoreszenz nach 28 Tagen Fixierung bereits deutlich schwächer war als bei den 1-Tage-Proben, wurde hier nachträglich auch noch sieben Tage fixiertes Material untersucht, um eine bessere Vorstellung über den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzverminderung zu erhalten.

Zur Überprüfung, ob die eingesetzten Nachweismethoden nur den apoptotischen oder auch den nekrotischen Zelltod aufzeigen, wurden die gleichen Färbungs- und Fixierungsprotokolle auch an Schnitten angewandt, in denen Nekrosen vorlagen. Hier erfolgte eine Ermittlung der Nekrose-Indizes (NI).

Die AI und NI der 3,5-tägigen Formaldehyd/Alkohol-Fixierung (1 Tag in Formaldehyd und anschließend 2,5 Tage in 70%igem Ethanol) werden im Folgenden graphisch und tabellarisch als 1-Tageswerte dargestellt.

4.1. Pathohistologische Untersuchung

Alle Lebern waren makroskopisch unverändert. In den Standard-H&E gefärbten Präparaten konnten folgende Befunde erhoben werden.

a) Kontrollen:

Es fanden sich keine pathohistologischen Veränderungen in den Leberpräparaten der Kontrolltiere.

b) Cyproteronacetat (CPA):

Zwei Tage nach dem Absetzen von Cyproteronacetat (CPA-2-Tage) wiesen die Leberzellen ein unregelmäßiges und wolkiges Erscheinungsbild auf. Aufgrund deutlicher Hypertrophie wölbten sich die Hepatozyten in die Sinusoide vor, so dass die Leberzellbalken im Vergleich zur Kontrolle breiter waren. Besonders deutlich konnte dies periportal beobachtet werden. Die teilweise merklich vergrößerten Zellkerne traten deutlich hervor. Bei stärkerer Vergrößerung fielen insbesondere in der periportal Zone eine Körnung des Zytoplasmas sowie zahlreiche eosinophile, meist ovale Zytoplasmainschlüsse auf. Diese wurden mit der PAS-Färbung als Glykogenansammlungen identifiziert. Zusätzlich konnten ungefärbte, teils zellkerngroße Vakuolen im Zytoplasma der perivenösen Hepatozyten mit Hilfe der ORO-Färbung von Gefrierschnitten als Fettvakuolen erkannt werden. Es fanden sich apoptotische Zellen und Körperchen, deren Zahl sich erheblich von Tier zu Tier unterschied. Gegenüber den Kontrollebern lag aber in jedem Präparat dieser Versuchstiergruppe eine deutliche Steigerung vor.

Im Vergleich zur 2-Tage-CPA-Gruppe nahm nach einer Erholungszeit von vier Tagen nach der letzten CPA-Applikation (CPA-4-Tage) das Ausmaß der Leberzellhypertrophie zu. Das Verschwinden der sehr großen Hepatozytenkerne führte dazu, dass im Vergleich zur CPA-2-Tage-Gruppe wieder einheitlichere Kerngrößen erkennbar waren. Weiterhin verringerte sich das Ausmaß der Zellverfettung geringgradig. Die Zahl der Apoptosen variierte auch in dieser Gruppe von Tier zu Tier erheblich.

c) Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄):

Das mikroskopische Bild war von einer mittel- bis hochgradigen perivenösen Nekrose bestimmt. Begleitet wurde diese von geringgradiger feinvakuolärer Verfettung der Hepatozyten, spärlichem Auftreten neutrophiler Granulozyten und Histiozyten mit sporadischem Kollaps von Leberzellbalken. Von diesen Veränderungen waren alle abführenden Venen betroffen, es zeigte sich aber bei den Einzeltieren ein unterschiedlich starkes Ausmaß dieser Veränderungen. Tier 19 wies eine Brückenbildung der Nekrosezonen zwischen benachbarten perivenösen Arealen auf, wohingegen sich bei den anderen Tieren dieser Versuchstiergruppe die nekrotischen Zellen auf die unmittelbare Umgebung der abführenden Venen beschränkten. Der Kollaps von Leberzellbalken in den perivenösen Zonen war in der Leber dieses Tieres Nr. 19 ebenfalls stärker ausgeprägt. Apoptotische Zellen oder Körperchen konnten in keinem dieser Präparate festgestellt werden.

4.2. Ergebnisse der Vorversuche

4.2.1. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Im Vorversuch der immunhistochemischen Darstellung der Apoptosen mit der TUNEL-Methode wurden, neben der beigefügten Färbearbeitung des Herstellers, weitere Protokolle getestet. Neben der vom Hersteller empfohlenen Proteinvorverdauung, hier mit 20 µg/ml Protease (von *Streptomyces griseus*), wurde auch eine Konzentration von 40 µg/ml eingesetzt oder überhaupt keine Vorverdauung durchgeführt.

Desweiteren wurde stichprobenmäßig an jeweils zwei Gewebeschnitten der CPA-Gruppen (1 Tag Fixierung) eine vorherige Inkubation mit 5%iger Levamisollösung zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase für 20 und 40 Minuten angewandt.

Im Vergleich zu den Präparaten ohne Proteinvorverdauung ergab eine Vorverdauung mit 20 µg/ml Protease ein geringgradig intensiveres Färbepild der apoptotischen Körperchen. Hingegen erbrachte die Konzentrierung auf 40 µg/ml keine zusätzliche Steigerung der Anfärbung.

Die Ansätze mit Levamisol ergaben keine deutlich verbesserten Färbeergebnisse, so dass das ursprüngliche Protokoll des Herstellers für alle Leberpräparate verwandt wurde.

Zudem wurden einige TUNEL-gefärbte Präparate (siehe Färbeprotokoll Kap. 3.3.3.2.) mittels eines rechnergestützten Bildanalysesystems ausgewertet. Hierbei ergaben sich Probleme bei der Erfassung der kleineren apoptotischen Körperchen, da bei einer Einstellung auf deren Größe die gleichfalls TUNEL-positiven nicht-hepatozellulären Signale (z.B. Kupffer-Zellen) ebenfalls automatisch gezählt wurden. Demgegenüber wurden schwach oder ungefärbte AB nicht erfasst (siehe auch Kap. 4.3.3.2.1.).

4.2.2. Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Standard-H&E)

Auch die Standard-H&E-gefärbten Präparate wurden versuchsweise mit Hilfe des rechnergestützten Bildanalysesystems auf eine automatische Ermittlung der AB überprüft. Allerdings konnten hierbei aufgrund fehlender bzw. zu geringer Farbkontraste ausschließlich unbrauchbare Daten erhoben werden.

4.2.3. Alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (alkoholische H&E) zur Darstellung der Eosinfluoreszenz

Es wurden bei der Herstellung der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie Konzentrationen der alkoholischen Eosinlösung von 0,3%, 0,4% und 1,0% getestet.

Die unter Verwendung einer 0,3%igen alkoholischen Eosinlösung angefertigten Schnitte wiesen bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop kaum Fluoreszenz auf. In der Übersicht konnten keine apoptotischen Körperchen (AB) erkannt werden. Bei Verwendung der studienrelevanten Vergrößerung (400-fach) verbesserte sich dieser Zustand nur unwesentlich, es bestand lediglich ein geringer Kontrast zwischen dem fluoreszierenden Signal und der Umgebung. Bei Umschaltung auf die Standard-Lichtmikroskopie waren die apoptotischen Körperchen durch eine nur geringgradig gegenüber den intakten Leberzellen erhöhte Eosinophilie gekennzeichnet. Zusätzlich konnten die Strukturen der Leber kaum erkannt werden.

Hingegen konnten bei der von STINCHCOMBE (1996) bevorzugten 0,4%igen Lösung einige apoptotische Körperchen bereits in der Übersicht identifiziert werden. Bei der 400-fachen Vergrößerung hoben sie sich in der Regel durch eine stärkere Fluoreszenz sehr gut von den nicht-apoptotischen Hepatozyten (Hintergrund) ab. Die für Apoptosen beschriebene typische Eosinophilie war bei der standardlichtmikroskopischen Betrachtung mäßig ausgeprägt.

Bei stärkerer Konzentrierung des Eosins (1,0%) zeigten auch die Intima der Gefäße, die kleinen ovalen zytoplasmatischen Glykogeneinschlüsse in Hepatozyten sowie die gesamten intakten Hepatozyten zunehmende Fluoreszenz. Dies führte zu einer verminderten Erkennbarkeit insbesondere der apoptotischen Körperchen ohne Chromatinfragmente. Allerdings war bei Einsatz der 1%igen Eosinlösung im Standard-Lichtmikroskop eine morphologische Kontrolle der AB aufgrund der stärkeren Färbintensität im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen besser möglich. Dagegen konnten mittels der Fluoreszenz-Methode aufgrund des hohen Hintergrundsignals nur noch einzelne AB deutlich erkannt werden. Die höher konzentrierte Lösung (1%) erschien somit aufgrund verstärkter Hintergrundfluoreszenz und "Maskierung" der AB für den vorgesehenen Zweck wenig sinnvoll.

Bei allen drei Eosinkonzentrationen zeichneten sich die apoptotischen Zellen mit dem sichelförmig an der Kernmembran kondensierten Chromatin (AC) nicht durch eine zusätzliche Fluoreszenz aus.

Um auszuschließen, dass die Wahl der Konzentration der Eosinlösung auf theoretischen und subjektiven Grundlagen beruht und um zu testen, ob sich die 1%ige Eosinlösung aufgrund der intensiveren Färbung nicht auch für die Fluoreszenzmikroskopie besser eignet, wurde die Auswertung einiger Testpräparate durchgeführt. Hierfür wurden Leberschnitte der Tiere der CPA-2-Tage-Gruppe herangezogen, da

diese die höchsten AI aufwiesen. Die Färbung mit der 0,3%igen Lösung ergab ein zu schwaches Fluoreszenzsignal, so dass kaum ein AB identifiziert werden konnte. Zusätzlich konnten die Strukturen der Leber auch bei der Standard-Lichtmikroskopie kaum erkannt werden. Daher wurden bei der Testauswertung ausschließlich die 1 Tag in Carnoy fixierten Präparate der 0,4%igen und der 1%igen alkoholischen H&E-Färbung herangezogen.

Tab. 10: 0,4%ige Eosinlösung: Gegenüberstellung der in der Standard-Licht- und/oder Fluoreszenzmikroskopie erkannten Apoptosen (absolut und AI in Prozent) bei der Auswertung von je 5000 Leberzellen

Tiernummer	Apoptosen		FS	AI [%]	
	LM/FM	LM		LM	FM
6	26	5	10	0,62	0,52
7	15	2	9	0,34	0,30
8	10	3	1	0,26	0,20
9	8	2	0	0,20	0,16
10	6	1	1	0,14	0,12
			MW	0,31	0,26
				100	83,33

LM/FM - Apoptosen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Standard-Lichtmikroskop erkannt wurden; LM – nur mit dem Standard-Lichtmikroskop erkannte AB und AC; FS - fluoreszierende nicht-apoptotische bzw. fragliche Signale; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; AB – Apoptotisches Körperchen; AC – Apoptotische Zelle; MW – arithmetischer Mittelwert

Tab. 11: 1%ige Eosinlösung: Gegenüberstellung der in der Standard-Licht- und/oder Fluoreszenzmikroskopie erkannten Apoptosen (absolut und AI in Prozent) bei der Auswertung von je 5000 Leberzellen

Tiernummer	Apoptosen		FS	AI [%]	
	LM/FM	LM		LM	FM
6	17	15	7	0,64	0,34
7	8	10	6	0,36	0,16
8	4	10	2	0,28	0,08
9	4	7	1	0,22	0,08
10	3	4	0	0,14	0,06
			MW	0,33	0,14
				100	43,90

Legende: siehe Tabelle 10

Aus den Tabellen 10 und 11 wird ersichtlich, dass bei den Färbungen mit der 0,4%igen bzw. 1%igen Eosinkonzentrationen im Standard-Lichtmikroskop annähernd gleiche Apoptose-Indizes (AI) ermittelt wurden. Demgegenüber wurden im

Fluoreszenzmikroskop bei der 1%igen Eosinlösung nur noch etwa halb so hohe AI ermittelt wie dies bei der 0,4%igen Lösung der Fall war.

Aufgrund dieser Daten wurde für die weiteren Untersuchungen die 0,4%ige Lösung verwandt.

Weiterhin wurden einzelne Präparate der rein Formaldehyd- sowie der Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben der CPA-2-Tage-Gruppe versuchsweise mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgemustert. Es zeigte sich, dass das Zytoplasma der unveränderten Hepatozyten sowie die elastischen Fasern der Gefäße stärker fluoreszieren, als dies nach Carnoy-Fixierung zu beobachten war. Da bei Umschaltung auf die Standard-Lichtmikroskopie erkannt wurde, dass ein Großteil der AB nicht eindeutig als solche im FM identifiziert werden konnten, wurde von weiteren Versuchen mit den genannten Fixierungen abgesehen.

4.3. Ergebnisse der Hauptversuche

4.3.1. Darstellung der Apoptosen und Nekrosen

4.3.1.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

a) Standard-Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung:

Bei den Standard-H&E-gefärbten Präparaten stellten die frühesten standardlichtmikroskopisch erkennbaren Stadien der Apoptose solche Zellen dar, die durch die sichel- bzw. halbmondförmige Anlagerung des kondensierten Chromatins an die Kernmembran charakterisiert waren. Vereinzelt war bei diesen seltenen Ereignissen bereits eine beginnende Abrundung und Ablösung aus dem Zellverband und/oder eine Eosinophilieverstärkung des Zytoplasmas zu erkennen. Der größere Anteil der Apoptosen stellte sich als apoptotische Körperchen (AB) dar, die aus der Fragmentierung der apoptotischen Zellen entstanden sind. Die AB wiesen meist eine runde, teilweise auch eine ovale, aber glattrandige Gestalt sowie eine meist verstärkte zytoplasmatische Eosinophilie auf (siehe Abb. 20). Es konnte im Standard-Lichtmikroskop in Einzelfällen nicht immer eindeutig geklärt werden, ob die AB im Extrazellulärraum oder phagozytiert vorlagen. Auf dieses Problem haben bereits BURSCH et al. (1990) hingewiesen. Jedenfalls lag aber der Großteil der apoptotischen Körperchen phagozytiert im Zytoplasma der Hepatozyten und vereinzelt in Kupffer-Zellen vor. Weiterhin enthielten die AB im unterschiedlichen Ausmaß Chromatinfragmente und traten einzeln oder in Gruppen auf (siehe Abb. 20). In Einzelfällen war eine bohnenförmige Einkerbung des Zellkerns der phagozytierenden Zelle zu erkennen (siehe Abb. 22).

Nach GOLDSWORTHY et al. (1996a, b) enthalten etwa 50% und nach BURSCH et al. (1985) circa 30% der AB Chromatinfragmente. Die Unterteilung in chromatinhaltige und -lose AB erfolgte in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den einzeln liegenden AB als auch bei den in einer Gruppe auftretenden AB, von denen angenommen wird, dass sie von einer Leberzelle stammen (BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b; STINCHCOMBE, 1996). Bei den AB-Gruppen genügte ein AB mit Chromatinfragmenten, um es den chromatinhaltigen AB zuzuordnen. Dieses Zählprinzip wurde beibehalten, um die Daten mit den Ergebnissen der TUNEL-Methode, bei welcher nur chromatinhaltige AB erfasst werden (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b), vergleichen zu können. In den folgenden Tabellen sind die absoluten Zahlen der AB je Versuchstiergruppe (AB pro 75 000 Leberzellen bei jeweils 5 Tieren) und der jeweilige prozentuale Anteil der chromatinhaltigen AB bzw. AB-Gruppen dargestellt. Die Daten der Einzeltiere sind den Tabellen 26-31 zu entnehmen.

Tab. 12: Chromatinhaltige und -lose AB in der Standard-Lichtmikroskopie nach Standard-H&E-Färbung und reiner Formaldehyd-Fixierung

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe	AB (Anzahl pro jeweils 75 000 Zellen)		AB (in %)
		mit Chromatin	ohne Chromatin	mit Chromatin
1 Tag	Kontrolle	10	6	62,50
	CPA-2-Tage	139	93	59,91
	CPA-4-Tage	74	61	54,81
28 Tage	Kontrolle	8	2	80,00
	CPA-2-Tage	166	100	62,41
	CPA-4-Tage	91	43	67,91
92 Tage	Kontrolle	8	3	72,73
	CPA-2-Tage	179	65	73,36
	CPA-4-Tage	104	42	71,23

AB – Apoptotische Körperchen; AB (in %) – prozentualer Anteil der chromatinhaltigen AB an der Summe der AB (mit und ohne Chromatin); CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug

Tab. 13: Chromatinhaltige und -lose AB in der Standard-Lichtmikroskopie nach Standard-H&E-Färbung und Formaldehyd/Alkohol-Fixierung

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe	AB (Anzahl pro jeweils 75 000 Zellen)		AB (in %)
		mit Chromatin	ohne Chromatin	mit Chromatin
1 Tag	Kontrolle	6	7	46,15
	CPA-2-Tage	157	91	63,31
	CPA-4-Tage	100	36	73,53
28 Tage	Kontrolle	8	2	80,00
	CPA-2-Tage	176	116	60,27
	CPA-4-Tage	125	58	68,31
92 Tage	Kontrolle	18	8	69,23
	CPA-2-Tage	254	135	65,30
	CPA-4-Tage	116	33	77,85

Legende: siehe Tabelle 12

Das Zytoplasma der zentrolobulären Nekrosen wies gegenüber den umgebenden, intakten Hepatozyten in der Regel eine schwächere Eosinophilie auf. Die Zellgrenzen waren bei kleineren Fragmenten nicht in jedem Fall eindeutig erkennbar, die Zelleiber stellten sich gering- bis hochgradig geschwollen dar. Häufig waren im Zytoplasma deutliche, ungefärbte Vakuolen erkennbar, die in keinem Fall bei den Apoptosen zu beobachten waren. Chromatinfragmente fanden sich in den nekrotischen Zellen bzw. Zellfragmenten in unterschiedlich großem Ausmaß und meist in granulärer Gestalt.

Aus den Tabellen 63-68 kann entnommen werden, dass in der Versuchstiergruppe, die einmalig CCl₄ verabreicht bekam, der Anteil der nekrotischen Zellen mit Chromatinfragmenten geringere Schwankungen aufwies als der Prozentsatz der chromatinhaltigen AB. Im Gruppendurchschnitt wurden Werte von 57,12% bis 62,27% bei reiner Formaldehyd-Fixierung bzw. 58,89% bis 65,37% bei den 1 Tag in Formaldehyd fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben erhalten.

b) Alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung:

Durch die schwache eosinophile Färbung bei der alkoholischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung (alkoholische H&E) zeigten die Apoptosen im Standard-Lichtmikroskop meist nur eine undeutliche zytoplasmatische Eosinophilieverstärkung. In einzelnen Fällen war die eindeutige morphologische Identifizierung insbesondere der chromatinlosen apoptotischen Körperchen nicht möglich. Im Übrigen entsprachen die Merkmale der Apoptosen im Wesentlichen den unter a) genannten Kriterien.

Auch hier erfolgte eine Auftrennung in AB mit und ohne Chromatinfragmente. Die Ergebnisse der nachträglich ausgewerteten 7 Tage in Carnoy fixierten Präparate sind ergänzend mit aufgelistet. Die Einzeltierdaten sind in den Tabellen 32-35 aufgeführt.

Tab. 14: Chromatinhaltige und -lose AB in der Standard-Lichtmikroskopie nach alkoholischer H&E-Färbung und Carnoy-Fixierung

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe	AB (Anzahl pro jeweils 75 000 Zellen)		AB (in %)
		mit Chromatin	ohne Chromatin	mit Chromatin
1 Tag	Kontrolle	10	4	71,43
	CPA-2-Tage	107	115	48,20
	CPA-4-Tage	90	34	72,58
7 Tage	Kontrolle	6	3	66,67
	CPA-2-Tage	109	64	63,01
	CPA-4-Tage	49	35	58,33
28 Tage	Kontrolle	7	1	87,50
	CPA-2-Tage	117	52	69,23
	CPA-4-Tage	61	14	81,33
92 Tage	Kontrolle	6	3	66,67
	CPA-2-Tage	103	72	58,86
	CPA-4-Tage	78	17	82,11

Legende: siehe Tabelle 12

Gegenüber der Standard-H&E-Färbung waren nach dem Einsatz einer alkoholischen Eosinlösung (alkoholische H&E-Färbung) die Zellmembranen der nekrotischen Zellen um ein weiteres undeutlicher. Zudem färbte sich das Zytoplasma kaum an. Die unter a) beschriebenen Kriterien (Vakuolen, Chromatinfragmente) konnten auch hier bei den Nekrosen festgestellt werden.

In dieser Versuchstiergruppe (jeweils 5 Tiere) wiesen die nekrotischen Zellen bei den über einen unterschiedlich langen Zeitraum in Carnoy fixierten Präparaten nach Auswertung im Standard-Lichtmikroskop zu 55,29% bis 58,46% (siehe Tab. 69-72) Chromatinfragmente auf. Diese Werte liegen etwas unter den unter a) dieses Abschnitts genannten Daten nach reiner Formaldehyd-Fixierung oder Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung.

4.3.1.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Bei den morphologisch als solche erkennbaren apoptotischen Zellen lag nach dem Einsatz der TUNEL-Methode ausschließlich ein positiver (gefärbter) Zellkern vor. Die apoptotischen Körperchen (AB) wiesen dagegen vornehmlich eine sehr kräftige komplette Anfärbung auf (siehe Abb. 21 und 22).. Ergänzend traten schwächer bis nicht gefärbte AB auf. Phagozytierte apoptotische Körperchen (AB) konnten hauptsächlich in TUNEL-negativen (ungefärbten), morphologisch unveränderten Leberzellen aufgefunden werden. Vereinzelt zeigten die phagozytierenden Leberzellen ebenfalls eine leichte Zytoplasmafärbung (siehe Abb. 22). Zusätzlich konnten Zytoplasma-positive, morphologisch unveränderte Hepatozyten festgestellt werden, die keine sichtbaren AB aufwiesen (siehe Abb. 21). Derartige Parenchymzellen wurden nicht in die Ermittlung der Apoptose-Indizes einbezogen. Ebenso blieben die positiven nicht-hepatozellulären Signale (z.B. Kupffer-Zellen) unberücksichtigt.

Die Ermittlung der Nekrose-Indizes bereitete Schwierigkeiten, da durch die schwache Anfärbung mit Hämatoxylin (Gegenfärbung) die Plasmamembranen der TUNEL-negativen nekrotischen Zellen nicht eindeutig zu erkennen waren. Es wurde daher in diesen Präparaten nur die Anzahl der TUNEL-positiven Nekrosen erfasst. In den nekrotischen Zellen wurden vornehmlich kleine, granuläre Anteile deutlich markiert. Wiesen diese Zellen eine komplette Anfärbung auf, war neben der granulären noch eine schwache Zytoplasmamarkierung zu erkennen. Selbst bei kompletter Anfärbung konnte durch die deutlich schwächere Zytoplasmafärbung sowie durch die Morphologie ein deutlicher Unterschied zu den Apoptosen gesehen werden (siehe Abb. 23).

Weder bei den apoptotischen noch bei den nekrotischen Zellen konnte eine eindeutige Korrelation der in der Standard-Lichtmikroskopie erfassten chromatinhaltigen Fragmente zu den Ergebnissen der TUNEL-Methode ermittelt werden. Die Daten der Einzeltiere der verschiedenen Nachweismethoden sind den entsprechenden Tabellen im Anhang zu entnehmen.

4.3.1.3. Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Apoptotische Zellen mit den sichel- bzw. halbmondförmigen Chromatinkondensaten zeigten keine verstärkte Fluoreszenz. Fluoreszierende apoptotische Körperchen hoben sich dagegen in der Regel sehr deutlich von dem Umgebungsgewebe ab. Mit einem zunehmenden Anteil an Chromatinresten im AB wurde häufig ein abnehmen-

des Fluoreszenzsignal festgestellt. Allerdings zeigte sich beim Fehlen einer Fluoreszenz nicht in jedem Fall ein erkennbarer Zusammenhang mit dem Chromatingehalt der AB. Die weiteren Beobachtungen entsprachen im Wesentlichen denen der Standard-H&E-Präparate (Kap. 4.3.1.1.).

Bei der Unterteilung der AB bzw. AB-Gruppen in chromatinhaltige und –lose Körperchen wurden bei den Versuchstiergruppen (jeweils 5 Tiere, siehe Tab. 57-60) folgende Daten ermittelt:

Tab. 15: Chromatinhaltige und –lose AB in der Fluoreszenzmikroskopie nach alkoholischer H&E-Färbung und Carnoy-Fixierung

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe	AB (Anzahl pro jeweils 75 000 Zellen)		AB (in %)
		mit Chromatin	ohne Chromatin	mit Chromatin
1 Tag	Kontrolle	7	4	63,64
	CPA-2-Tage	85	115	42,50
	CPA-4-Tage	71	33	68,27
7 Tage	Kontrolle	5	3	62,50
	CPA-2-Tage	77	64	54,61
	CPA-4-Tage	34	35	49,28
28 Tage	Kontrolle	4	1	80,00
	CPA-2-Tage	69	51	57,50
	CPA-4-Tage	35	14	71,43
92 Tage	Kontrolle	1	3	25,00
	CPA-2-Tage	55	67	45,00
	CPA-4-Tage	30	17	63,83

Legende: siehe Tabelle 12

Zusätzlich wiesen auch die nekrotischen Zellen teilweise eine Fluoreszenz auf, welche meist weniger intensiv war als bei den AB. Da die Chromatinfragmente in der Regel von geringerer Größe waren als in den AB (siehe Kap. 4.3.1.2.), lag in den Präparaten der Tiere, denen CCl₄ verabreicht wurde, scheinbar keine Maskierung der Fluoreszenzsignale (siehe Kap. 5.4.2.3.) vor. Im Gegensatz zur TUNEL-Methode konnten durch die deutlicheren Zellgrenzen auch die nicht-fluoreszierenden Nekrosen zahlenmäßig erfasst werden. Der Anteil der chromatinhaltigen, fluoreszierenden nekrotischen Zellen betrug nach den verschiedenen Fixierungszeiten 44,30% bis 48,85% (siehe Tab. 79-82). Diese Werte lagen etwas unter den Daten, die bei der Standard-Lichtmikroskopie ermittelt wurden (siehe Kap. 4.3.1.1. Abschnitt b).

4.3.2. Apoptose- und Nekrose-Indizes der Einzeltiere

Sowohl bei der Apoptose- als auch bei der Nekroseinduktion bestanden starke individuelle Schwankungen.

Im Folgenden werden die Schwankungen der Einzeltierwerte am Beispiel der einen Tag rein Formaldehyd-fixierten, Standard-H&E-gefärbten Schnitte veranschaulicht. Die Apoptose- und Nekrose-Indizes der Einzeltiere sowie die geometrischen Mittelwerte der Versuchstiergruppen werden im Anhang dargestellt (Tab. 26-35, 36 (Standard- und alkoholische H&E) Tab. 43, 56 (TUNEL-Methode), Tab. 57-60, 61 (Eosin-fluoreszenz) für die Daten aus dem Apoptosenachweis bzw. Tab. 63-72, 73-78, 79-82, 83-85 (entsprechende Daten der CCl₄-Gruppe))

Tab. 16: Apoptose- bzw. Nekrose-Indizes in Prozent (1 Tag Fixierung in Formaldehyd; Standard-H&E-Färbung)

Kontrolle	Tier-Nr.: AI [%]	1 0,020	2 0,033	3 0,013	4 0,020	5 0,020
CPA-2-Tage	Tier-Nr.: AI [%]	6 0,680	7 0,293	8 0,333	9 0,093	10 0,147
CPA-4-Tage	Tier-Nr.: AI [%]	11 0,127	12 0,053	13 0,487	14 0,067	15 0,173
CCl₄	Tier-Nr.: NI [%]	16 0,807	17 0,853	18 0,400	19 3,507	20 1,007

H&E - Hämatoxylin-Eosin; CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; NI [%] – Nekrose-Index in Prozent; CCl₄ - Tetrachlorkohlenstoff.

In den Lebern der Kontrolltiere wurden 2 bis 3,3 Apoptosen pro 10 000 Hepatozyten erfasst.

In der CPA-2-Tage-Gruppe wurden bei Tier Nr. 6 mit 68 Apoptosen pro 10 000 Hepatozyten der höchste AI festgestellt. Demgegenüber wurde bei Tier Nr. 9 aus der gleichen CPA-Gruppe der AI als weniger als ein Siebtel dieses Wertes ermittelt. In der CPA-4-Tage-Gruppe, die zwei Tage später getötet wurden, traten gleichfalls starke individuelle Unterschiede auf, wobei hier sogar bis zu neunfache Unterschiede ermittelt wurden. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Tiere zu den Dosisgruppen (CPA) war anhand der Apoptose-Indizes nicht möglich.

Die Tiere der Versuchsgruppe, bei denen in der Leber Nekrosen induziert wurden, wiesen eine stark variierende Empfindlichkeit gegenüber dem Hepatotoxin CCl₄ auf. Dies spiegelt sich in bis zu neunfachen Abweichungen der NI (0,4%-3,5%) wieder.

4.3.3. Vergleich der Methoden für den Nachweis der Apoptose

Die erhaltenen Mittelwerte wurden für die weitere Beschreibung der Daten wegen der rechtsschiefen Verteilung zunächst logarithmiert und gruppenweise (jeweils fünf Tiere) zu einem arithmetischen Mittelwert zusammengefasst. Zur Gewährleistung einer verständlicheren Interpretation wurde der geometrische Mittelwert durch Entlogarithmierung berechnet. Die Transformierung der Daten (geometrische Mittelwerte) wurde in Kapitel 3.5. beschrieben. Im Folgenden wurden die geometrischen Mittelwerte der Versuchstiergruppen für die angewandten Nachweismethoden (Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische H&E-Färbung) bzw. TUNEL-Färbung sowie Eosinfluoreszenz) graphisch separat dargestellt. Die Zeitangaben an den Abszissen der Graphiken beziehen sich auf die Dauer der Fixierung. Bei der Berechnung der 95%igen Vertrauensintervalle der Mittelwerte (entsprechen den Fehlerbalken in den Graphiken) wurden die individuellen Schwankungen der Versuchstiere nicht mehr berücksichtigt. Diese Rechengänge wurden durchgeführt, um die Effekte der Fixierungsmittel, der Fixierungszeiten und der Nachweismethode sowie eventuell bestehende Abhängigkeiten unabhängig von den individuellen Schwankungen darstellen zu können.

4.3.3.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Die quantitative Erfassung der Apoptosen in H&E-gefärbten Leberpräparaten erfolgte an Material nach der reinen Formaldehyd-Fixierung und der Kurzzeit-Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol (Standard-H&E) sowie an dem in Carnoy fixierten Material (alkoholische H&E). Bei den letztgenannten Leberpräparaten lag aufgrund der Anwendung einer 0,4%igen alkoholischen Eosinlösung lediglich eine schwache Eosinanfärbung der Schnitte vor. Ein Nachteil, der für eine optimale Fluoreszenz der AB in Kauf genommen werden musste.

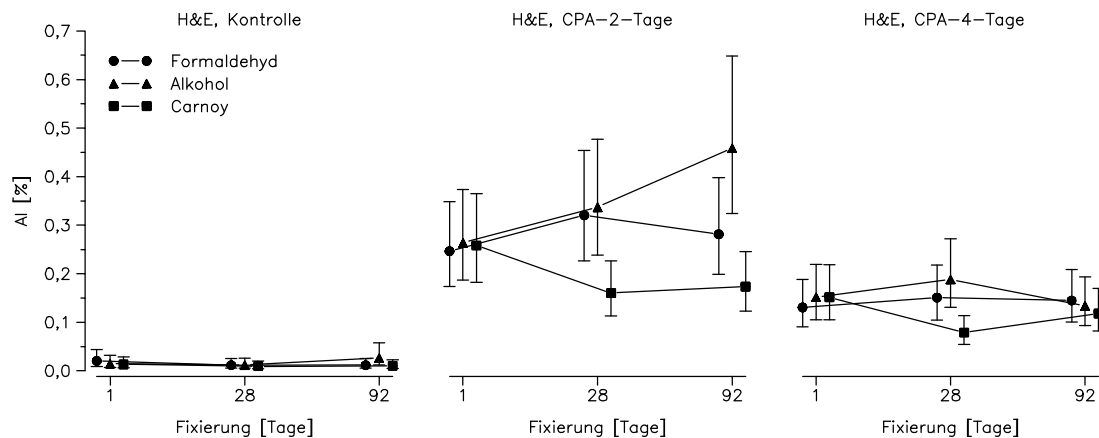


Abb. 4: Gegenüberstellung der geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen in den verschiedenen fixierten Präparaten, die mit der Standard-H&E-Färbung (reine Formaldehyd- und Formaldehyd/Alkohol-Fixierung) bzw. mit der alkoholischen H&E-Färbung (Carnoy-Fixierung) angefertigt wurden.

H&E – Hämatoxylin-Eosin (Standard-H&E bei der reinen Formaldehyd- und Formaldehyd/Alkohol-Fixierung; alkoholische H&E bei der Carnoy-Fixierung); CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; Formaldehyd – ausschließliche Fixierung in Formaldehyd; Alkohol – Fixierung für zunächst einen Tag in Formaldehyd, anschließend für 2½, 27 bzw. 91 Tage in 70%igem Ethanol; Carnoy – Carnoysches Gemisch; Fehlerbalken - 95%iger Vertrauensbereich der geometrischen Mittelwerte.

Zum größten Teil überschnitten sich die Vertrauensintervalle der Mittelwerte (Fehlerbalken) bei den einzelnen Fixierungen deutlich. Vor allem nach kurzer Fixierung waren die Fehlerbalken bei den drei Fixierungen nahezu identisch. Aus der Abbildung 4 wird ersichtlich, dass die Apoptose-Indizes (AI) der rein in Formaldehyd fixierten und mit Standard-H&E gefärbten Gewebeproben überwiegend unter jenen der Proben lagen, die nach einer Kurzzeit-Formaldehyd-Fixierung anschließend in Alkohol aufbewahrt wurden (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung). Die Apoptose-Indizes der rein Formaldehyd-fixierten Lebern der CPA-Gruppen zeigten im Verlauf der Fixierung geringe Schwankungen.

Die Kurven der Ergebnisse aus der Formaldehyd/Alkohol-Fixierung verliefen zunächst annähernd parallel zu den Ergebniskurven der reinen Formaldehyd-Fixierung. Nach Ablauf der vierten Fixierungswoche wichen sie in zwei Gruppen (Kontrolle, CPA-2-Tage) leicht bzw. deutlich von den Mittelwerten der AI nach ausschließlicher Formaldehyd-Fixierung ab. Die höheren AI lagen nach dieser Fixierung nicht mehr im 95%igen Vertrauensbereich der Mittelwerte, die bei Auswertung der kürzesten Fixierungszeit erhalten wurden.

Die AI, die sich auf die Carnoy fixierten Lebern bezogen, lagen zu dem frühen Fixierungszeitpunkt (1 Tag) annähernd auf dem gleichen Niveau wie die der anderen bei-

den Fixierungsmethoden. Hiernach erfolgte bei den Carnoy-fixierten Proben ein deutlicher Abfall der AI auf ein Drittel bis halb so hohe Werte. Nach zwei weiteren Monaten Fixierung stiegen sie in der CPA-4-Tage-Gruppe wieder leicht an.

Ein Vergleich der Schwankungen der Mittelwerte im zeitlichen Verlauf der Fixierung erbrachte für die H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung) folgende Resultate: Die Schwankungsbreite der geometrischen Mittelwerte im Verlauf der Fixierung war bei der reinen Formaldehyd-Fixierung mit Ausnahme der unbehandelten Versuchstiergruppe am geringsten. Die Differenz zwischen den AI (Maximum und Minimum der geometrischen Mittelwerte bei den drei Fixierungszeiten) betrug in der Kontrollgruppe 0,008, bei der CPA-2-Tage-Gruppe 0,075 und bei der CPA-4-Tage-Gruppe 0,02. Dem standen größere Intervalle bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten (0,015 / 0,195 / 0,054) sowie den Carnoy-fixierten Leberpräparaten (0,004 / 0,098 / 0,073) gegenüber. Im Gegensatz zu den Kurvenverläufen der geometrischen Mittelwerte der AI nach Formaldehyd/Alkohol-Fixierung wurde bei der Carnoy-Fixierung ein in allen drei Versuchstiergruppen identischer Verlauf deutlich.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung in den Faktoren "Tag" (Fixierungszeit) und "Fixation" (Fixierungsmittel) ergab, dass die Apoptose-Indizes der Kontroll- und der CPA-2-Tage-Gruppe bei der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung) schwach signifikant ($p < 0,05$) durch die Fixierungszeit beeinflusst wurden. Hoch beziehungsweise schwach signifikante Unterschiede, die auf dem Einfluss der Fixierungsmittel beruhen, konnten nur für die Behandlungsgruppen CPA-2-Tage ($p < 0,001$) und CPA-4-Tage ($p < 0,05$) nachgewiesen werden. Eine signifikante bzw. schwach signifikante Wechselwirkung zwischen dem Einfluss durch das Fixierungsmittel und der Dauer der Fixierung bestand ebenfalls bei den Dosisgruppen (CPA-2-Tage) mit $p < 0,01$ und (CPA-4-Tage) mit $p < 0,05$, nicht aber bei der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigten die geometrischen Mittelwerte der rein Formaldehyd-fixierten Proben im Verlauf der Fixierung die geringsten Schwankungen. Die Apoptose-Indizes bei der Auswertung der zunächst Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben lagen mit größerer Variation des Kurvenverlaufes geringgradig über den Letztgenannten. Bei der Fixierung in Carnoy erfolgte bereits nach kurzer Fixierungszeit eine deutliche Reduktion der Nachweisbarkeit der apoptotischen Körperchen im Standard-Lichtmikroskop. Hierfür war zum Teil die relativ schwache Färbung verantwortlich, die sich aus der Notwendigkeit der Anwendung einer 0,4%igen alkoholischen Eosinlösung für die Fluoreszenzmikroskopie ergab.

4.3.3.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Die Einsatzmöglichkeit der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (tdT) wurde an den rein Formaldehyd- und den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Präparaten getestet. Hierbei handelte es sich um Serienschnitte zu den Standard-H&E-Präparaten. Die Präparate beider Nachweismethoden wurden bei identischen Ausgangspunkten auf die gleiche Weise ausgewertet, so dass den Daten Gebiete mit gleicher Lokalisation im Leberlappen zugrunde lagen.

4.3.3.2.1. TUNEL - Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen

Bei der Auswertung der mit der TUNEL-Methode behandelten Schnitte fiel eine unterschiedliche Farbtintensität der markierten Apoptosen auf. Neben sehr kräftig gefärbten fanden sich auch einige schwächer bis kaum angefärbte apoptotische Zellen bzw. Körperchen. Zusätzlich wurde eine geringe Anzahl an Apoptosen beobachtet, die keine Markierung (falsch negativ) aufwiesen (ca. 3% nach einem Tag Fixierung). Um herauszufinden, ob eine Verminderung der Färbeintensität mit der Dauer der Fixierung oder dem Fixierungsmittel in Zusammenhang standen, wurden die TUNEL-positiven Apoptosen nach der Farbtintensität in Gruppen eingeteilt. Ebenso erfolgte eine Auflistung der falsch negativen Ereignisse. Dies wurde im Hinblick auf eine angestrebte routinemäßige Auswertung von Studien mit einem rechnergestützten Bildanalysesystem durchgeführt. In der Testauswertung konnte festgestellt werden, dass die schwach gefärbten apoptotischen Körperchen von dem Analysegerät durch den zu geringen Kontrast nicht erfasst werden konnten. Weiterhin lieferte die Auswertung der Standard-H&E-Präparate mit der automatisierten Auswertung ausschließlich unbrauchbare Ergebnisse, da keine ausreichenden Kontraste für das Computersystem vorlagen (siehe Kap. 4.2.1. und 4.2.2.). Ebenso konnten die Fluoreszenzsignale hiermit nicht ausgewertet werden, so dass zur besseren Vergleichbarkeit der Daten ausnahmslos manuell gearbeitet wurde.

Die Einzeltierwerte und die Mittelwerte der Versuchstiergruppen sowie der Anteil der schwachen Signale an der Gesamtsumme wurden im Anhang (Tab. 37-42) dargestellt.

Bei den folgenden Abbildungen enthalten die Säulen die Summe der Apoptosen von jeweils 5 Versuchstieren bezogen auf jeweils 15 000 Hepatozyten. Es erfolgte eine Unterteilung in deutlich, schwach und sehr schwach gefärbte sowie TUNEL-negative

(ungefärbte) apoptotische Zellen und Körperchen. Kräftig rot gefärbte, schon in der Übersicht auffallende Apoptosen wurden in die Kategorie “deutlich” eingeordnet. “Schwach” gefärbte Apoptosen waren erst bei 400-facher Vergrößerung gut zu erkennen, wohingegen “sehr schwache” apoptotische Zellen und Körperchen nur einen leichten rosa Schimmer aufwiesen. Mit der TUNEL-Methode gar nicht markierte Apoptosen wurden der Gruppe “negativ” zugeordnet. Bei den negativen Apoptosen wurden, wie auch bei den positiven Signalen, nur morphologisch eindeutige apoptotische Zellen und Körperchen berücksichtigt.

Die Farbintensitäten wurden für die rein Formaldehyd- (Abb. 5-7) und die Formaldehyd/Alkohol-Fixierung (Abb. 8-10) getrennt dargestellt.

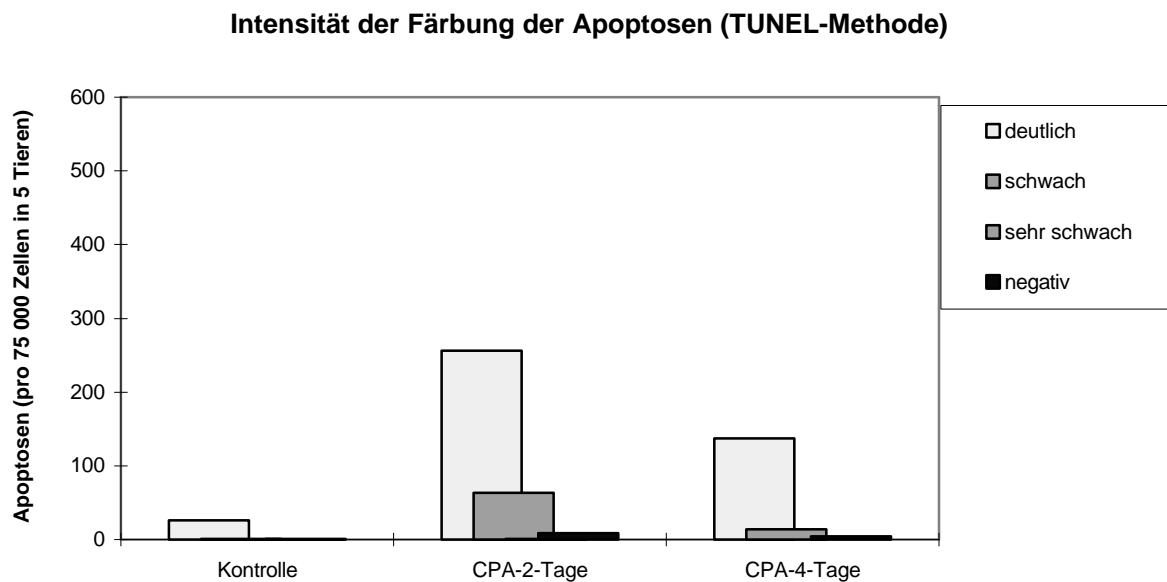


Abb. 5: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach 1 Tag Fixierung in Formaldehyd

TUNEL - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug; deutlich, schwach bzw. sehr schwach - deutlich, schwach bzw. sehr schwach gefärbte Apoptosen; negativ – ungefärbte Apoptosen

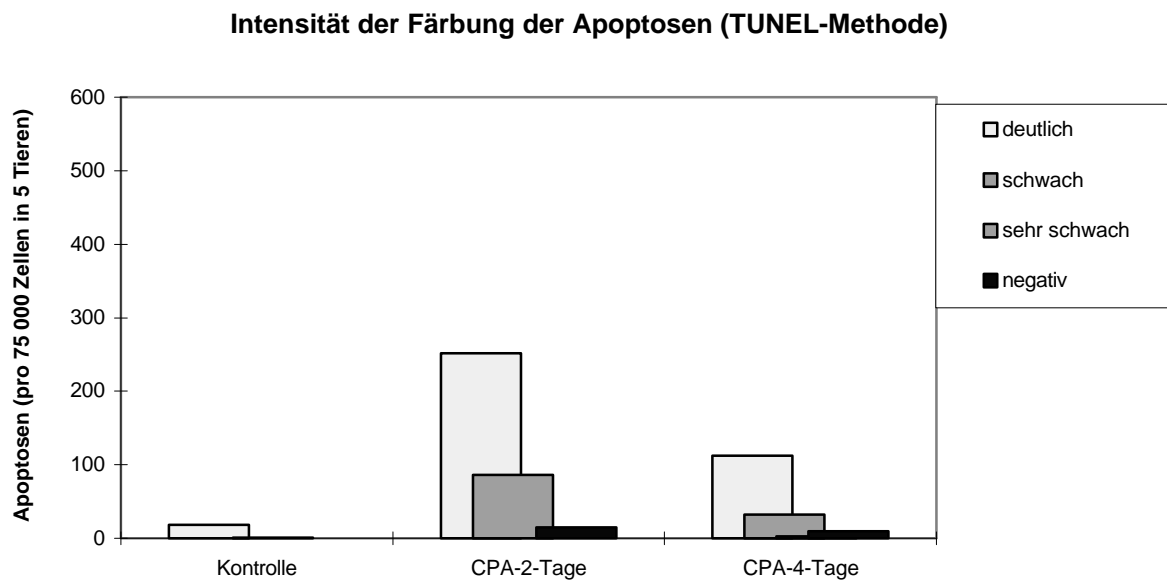


Abb. 6: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach 28 Tagen Fixierung in Formaldehyd.

Legende: siehe Abb. 5

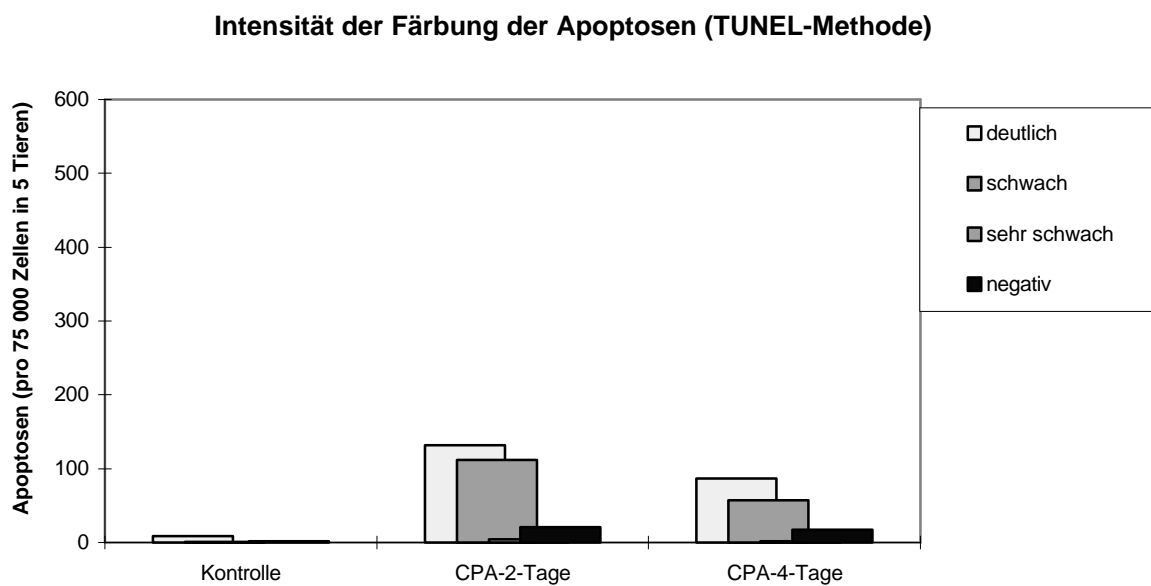


Abb. 7: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach 92 Tagen Fixierung in Formaldehyd.

Legende: siehe Abb. 5

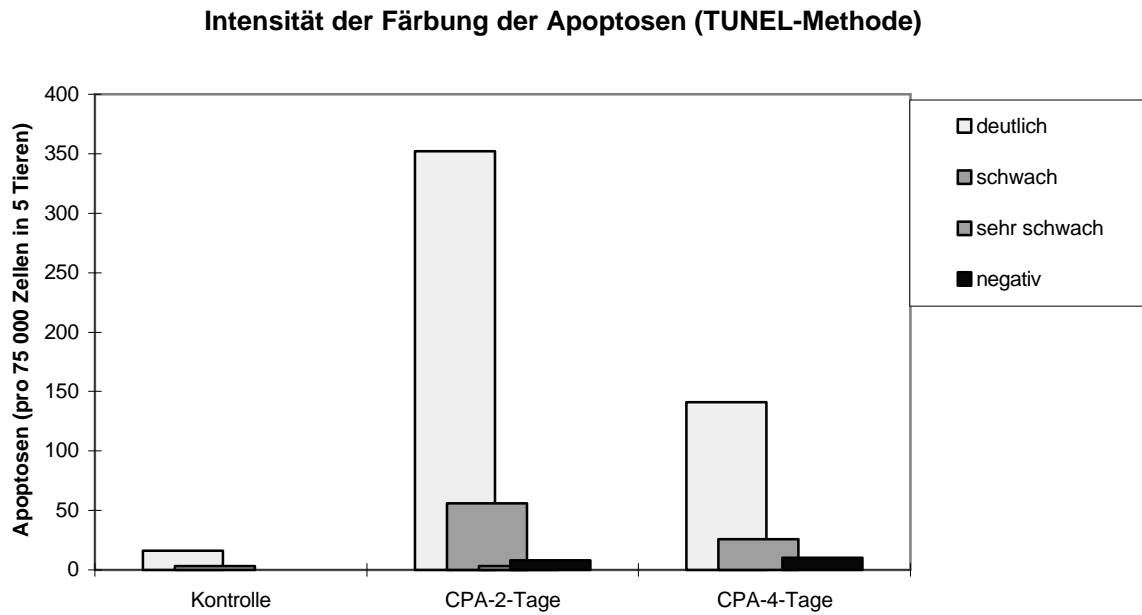


Abb. 8: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließender zweieinhalbtägiger Aufbewahrung in Alkohol.

Legende: siehe Abb. 5

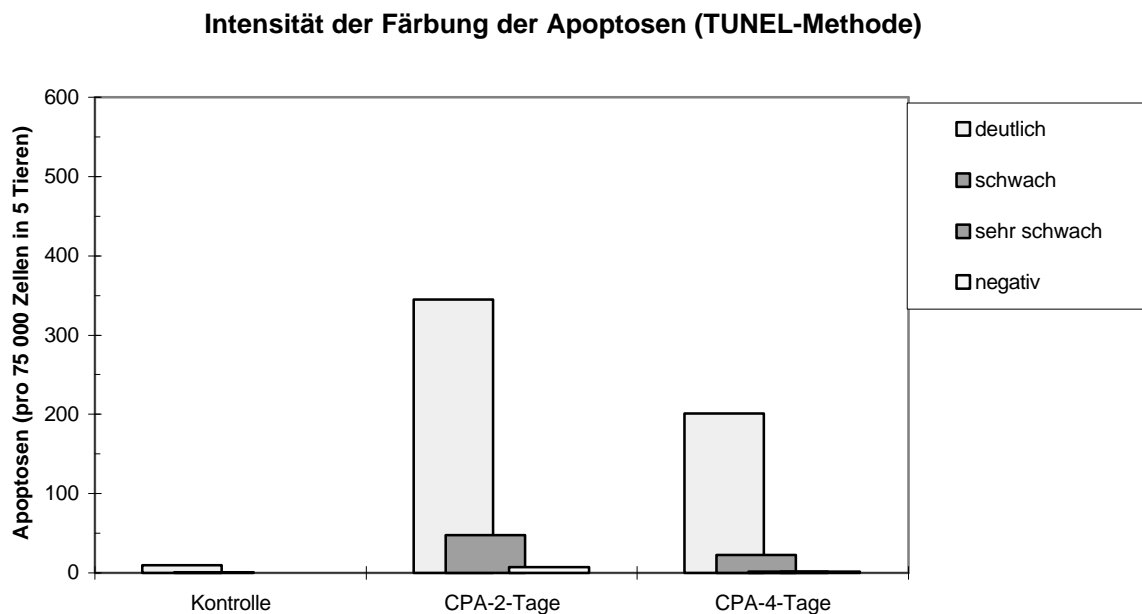


Abb. 9: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließender 27-tägiger Aufbewahrung in Alkohol.

Legende: siehe Abb. 5

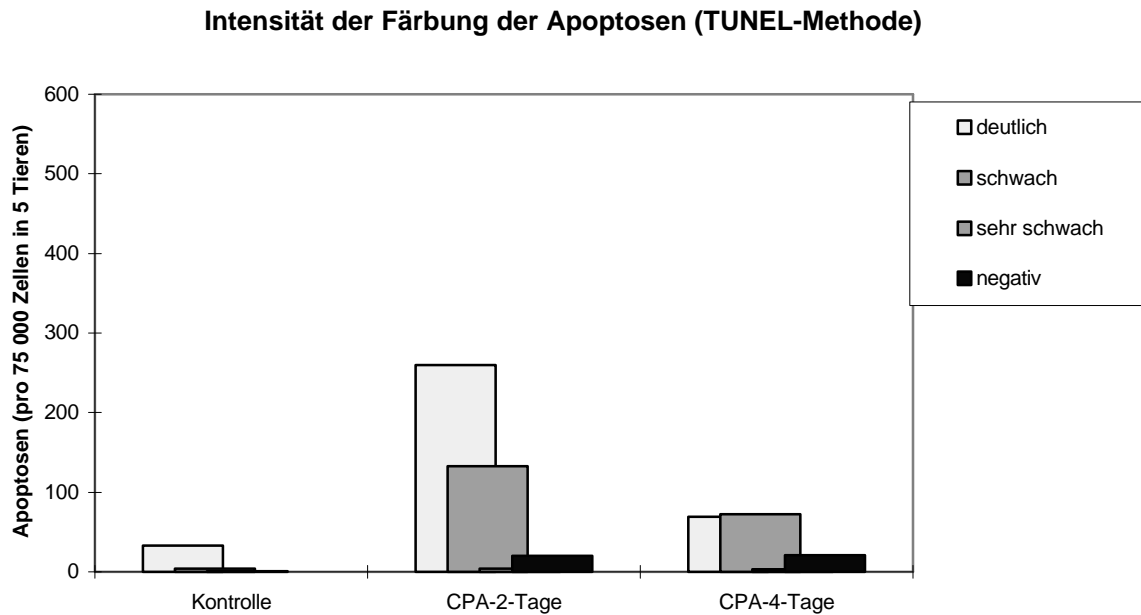


Abb. 10: Intensität der Färbung apoptotischer Zellen und Körperchen bei Anwendung der TUNEL-Methode nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließender 91-tägiger Aufbewahrung in Alkohol.

Legende: siehe Abb. 5

Die Kerne der apoptotischen Zellen mit der typischen sichel- bzw. halbmondförmigen Chromatinkondensation an der Kernmembran (frühes Apoptosestadium) waren zu 100% positiv. Apoptotische Körperchen (AB) fielen dagegen teilweise durch fehlende Markierung auf. Es lag generell nur ein kleiner Prozentsatz dieser ungefärbten (negativen) Ereignisse vor. Erstaunlich war, dass dieser Anteil ein größeres Ausmaß einnahm, als die der sehr schwach gefärbten AB. Mit der Fixierungszeit nahmen sowohl die schwächer gefärbten als auch TUNEL-negativen Signale deutlich zu. Hierbei lag die Anzahl der negativen Signale aber in jedem Fall weit unter der Zahl der gefärbten Apoptosen.

Bei der reinen Formaldehyd-Fixierung stiegen die Anteile der schwächeren Signale bei den CPA-Gruppen innerhalb der ersten vier Wochen Fixierung von durchschnittlich 16,6% (1 Tag) auf ca. 25% (28 Tage), um nach 92 Tagen fast 45% zu erreichen. Die Kontrollgruppe erbrachte durch die geringe Anzahl der Apoptosen keine klaren Ergebnisse und fiel teilweise aus diesem Rahmen heraus. Der Anteil gut gefärbter Ereignisse lag bei diesen Tieren meist etwas höher als bei den Dosisgruppen (Tab. 37-42). Eine ausgeprägte Abnahme der Signalstärke mit der Fixierungszeit, wie bei den CPA-Gruppen, war bei der Kontrollgruppe nicht zu beobachten.

Die Zahl der ungefärbten Apoptosen in allen Gruppen wies nach dreimonatiger Fixierung mehr als eine Verdreifachung auf (Anstieg von ca. 2,7% (1 Tag) auf etwa 9% (92 Tage)). Wie aus den Abbildungen 5-10 und den Tabellen 44-49 zu entnehmen

ist, war eine besonders steile Zunahme der ungefärbten Apoptosen ab einer Fixierungszeit von 28 Tagen zu beobachten.

In den zunächst Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben nahm, wie bei den rein Formaldehyd-fixierten Proben, der Anteil der schwachen Signale nach vier Wochen zunächst nur geringfügig zu. Gleichfalls zeigte sich nach dreimonatiger Fixierung eine stärkere Zunahme der schwach gefärbten Apoptosen bei gleichzeitigem Abfall der deutlich TUNEL-positiven Signale. Im Vergleich zur Routinefixierung (reine Formaldehyd-Fixierung; 9%) war der Anteil der negativen Apoptosen nach einer Fixierungszeit von 92 Tagen mit 6,6% (über alle Gruppen) etwa zwei Drittel so hoch.

Aus den Tabellen 37-42 wird ersichtlich, dass die Anteile der deutlichen Signale im Verlauf der ausschließlichen Fixierung in Formaldehyd im Durchschnitt um etwa 27,7% und bei der Formaldehyd/Alkohol-Fixierung durchschnittlich um 22,6% sanken. Dagegen nahm der Anteil der schwächeren Signale um 26,4% bzw. um 21,7% sowie der Anteil sehr schwacher Signale um 1,3% bzw. um 0,9% zu. Bei der Kontrollgruppe war besonders bei dem Formaldehyd/Alkohol-fixierten Material nur ein geringfügiger Unterschied der Färbeintensität zwischen der kürzesten und der längsten Fixierungszeit feststellbar.

4.3.3.2.2. TUNEL-positive, morphologisch unveränderte Hepatozyten und TUNEL-positive, nicht-hepatozelluläre Signale

In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen morphologisch unveränderten, TUNEL-positiven Hepatozyten und der Apoptose diskutiert. In Hepatozyten, die apoptotische Körperchen (AB) phagozytiert haben, soll es zu einer Freisetzung von DNS-Fragmenten in das Zytoplasma der intakten Zelle kommen (WIJSMAN et al., 1993; WHEELDON et al., 1995; CONSTAN et al., 1996; SHORT et al., 1997). Auf der anderen Seite wird berichtet, dass es sich bei der Zytoplasmafärbung um die Markierung präapoptotischer, morphologisch noch unveränderter Hepatozyten handelt (GORCZYCA et al., 1993b; KONG und RINGER, 1995; NEGOESCU et al., 1996; OYAIU et al., 1997).

Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die positiv markierten und gleichzeitig morphologisch unveränderten Zellen sowie die positiven nicht-hepatozellulären Signale der eigenen Untersuchungen den apoptotischen Zellen und Körperchen (TUNEL-positive und -negative) graphisch (Abb. 11-16) und tabellarisch (Tab. 44-49, 50-55) gegenübergestellt.

Bei den folgenden Abbildungen (Abb. 11-16) wurden die TUNEL-positiven Signale sowie die TUNEL-negativen Apoptosen der drei Versuchstiergruppen (Kontrolle, CPA-2-Tage, CPA-4-Tage) zusammengefasst (jeweils fünf Tiere). Es wurde unterschieden in:

- 1) TUNEL-positive Apoptosen, die sich aus der Summe der deutlichen, schwachen und sehr schwachen Signale (Abb. 5-10 und Tab. 37-42) ergaben
- 2) TUNEL-negative (ungefärbte) Apoptosen (Tab. 44-49)
- 3) morphologisch unveränderte, TUNEL-positive Hepatozyten. Sie unterschieden sich von den umgebenden unveränderten Hepatozyten nur durch ihre Zytoplasmamarkierung. Der Kern war nur in Ausnahmefällen ebenfalls schwach gefärbt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Abbau apoptotischer Körperchen und der damit verbundenen Freisetzung von DNS-Fragmenten in das Zytoplasma der phagozytierenden Leberzelle zu erkennen, erfolgte eine weitere Unterteilung in morphologisch unveränderte, TUNEL-positive Zellen, die
 - a) kein AB phagozytiert haben
 - b) ein oder mehrere AB in ihrem Zytoplasma aufwiesen.
 Die gefärbten apoptotischen Körperchen sind in der Gruppe der TUNEL-positiven Apoptosen enthalten.
- 4) In dem fünften Balken jeder Säulengruppe sind die TUNEL-positiven nicht-hepatozellulären Signale zusammengefasst worden.

TUNEL-positive und -negative Signale

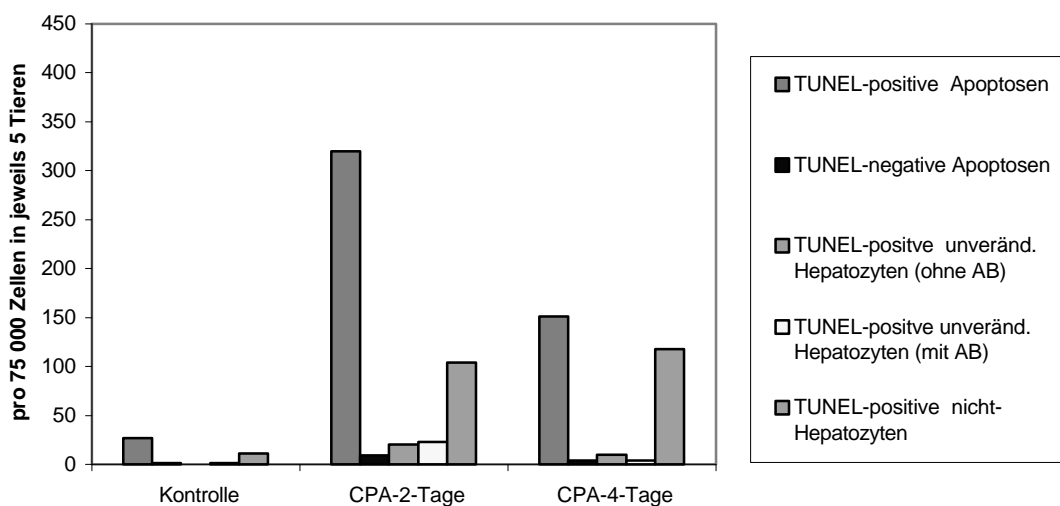


Abb. 11: TUNEL-positive und -negative Signale nach 1 Tag reiner Fixierung in Formaldehyd

TUNEL - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AB - Apoptotisches Körperchen; nicht-Hepatozyten – TUNEL-positive Signale in nicht-Hepatozyten

TUNEL-positive und -negative Signale

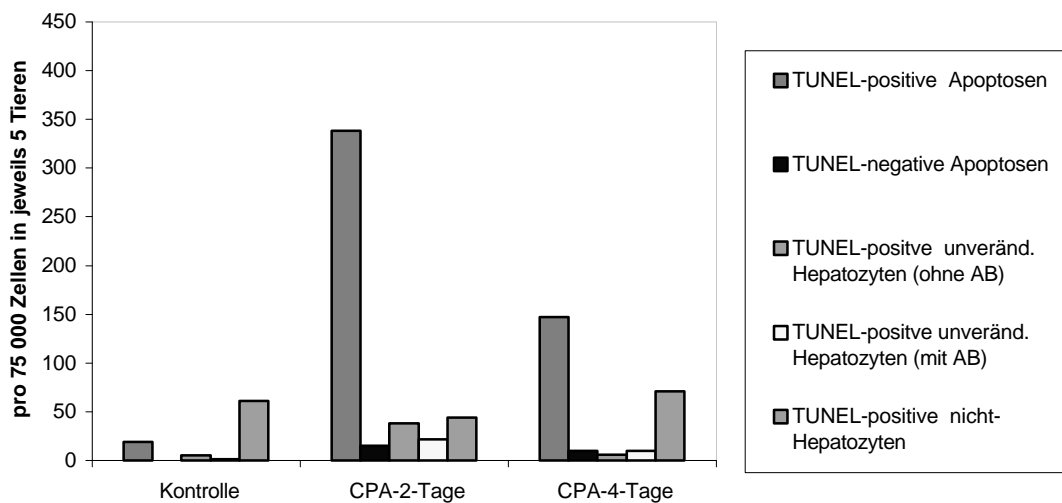


Abb. 12: TUNEL-positive und -negative Signale nach 28 Tagen reiner Fixierung in Formaldehyd

Legende: siehe Abb. 11

TUNEL-positive und -negative Signale

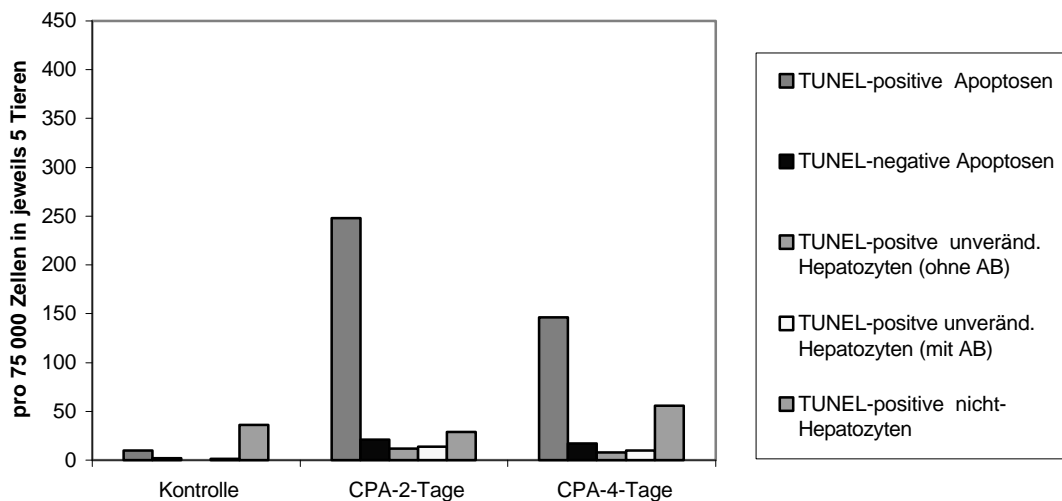


Abb. 13: TUNEL-positive und -negative Signale nach 92 Tagen reiner Fixierung in Formaldehyd

Legende: siehe Abb. 11

TUNEL-positive und -negative Signale

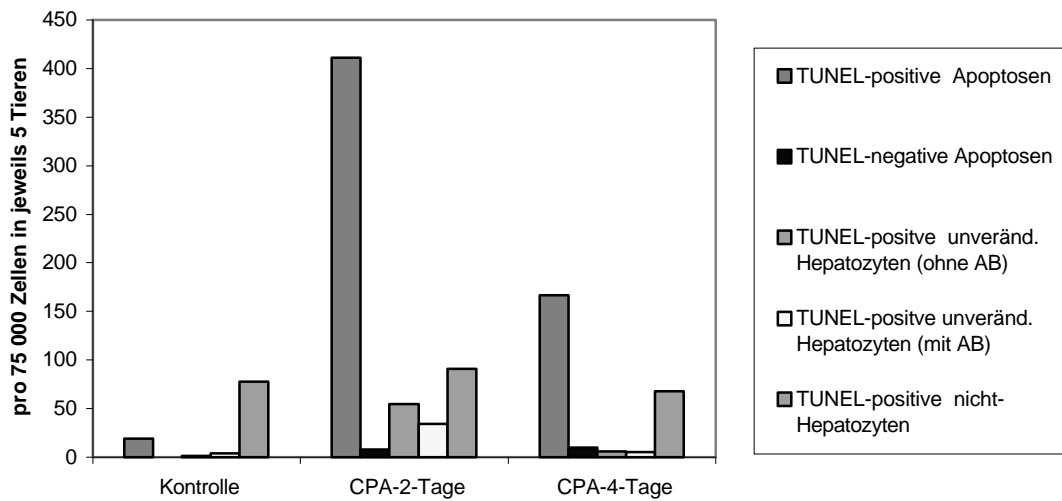


Abb. 14: TUNEL-positive und -negative Signale nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und zweieinhalbtagiger Aufbewahrung in Alkohol

Legende: siehe Abb. 11

TUNEL-positive und -negative Signale

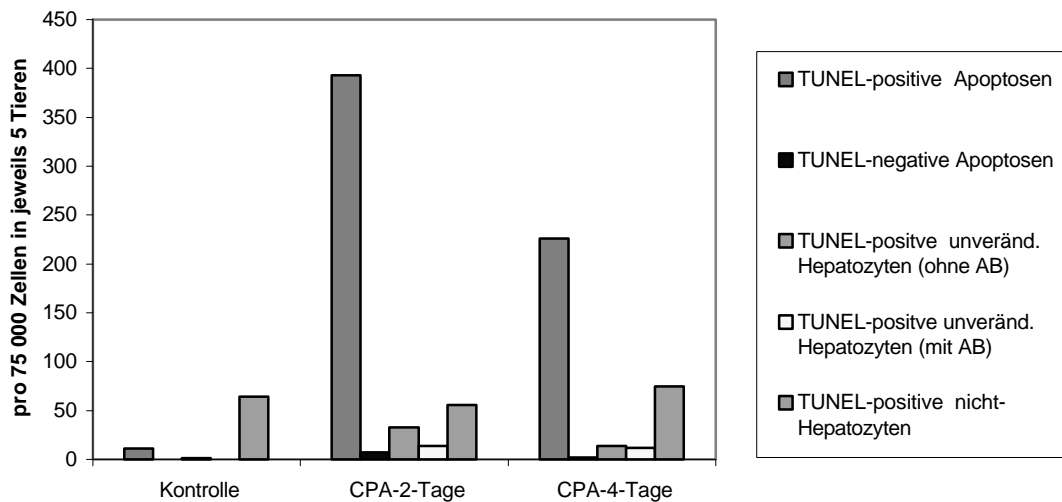


Abb. 15: TUNEL-positive und -negative Signale nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und 27-tägiger Aufbewahrung in Alkohol

Legende: siehe Abb. 11

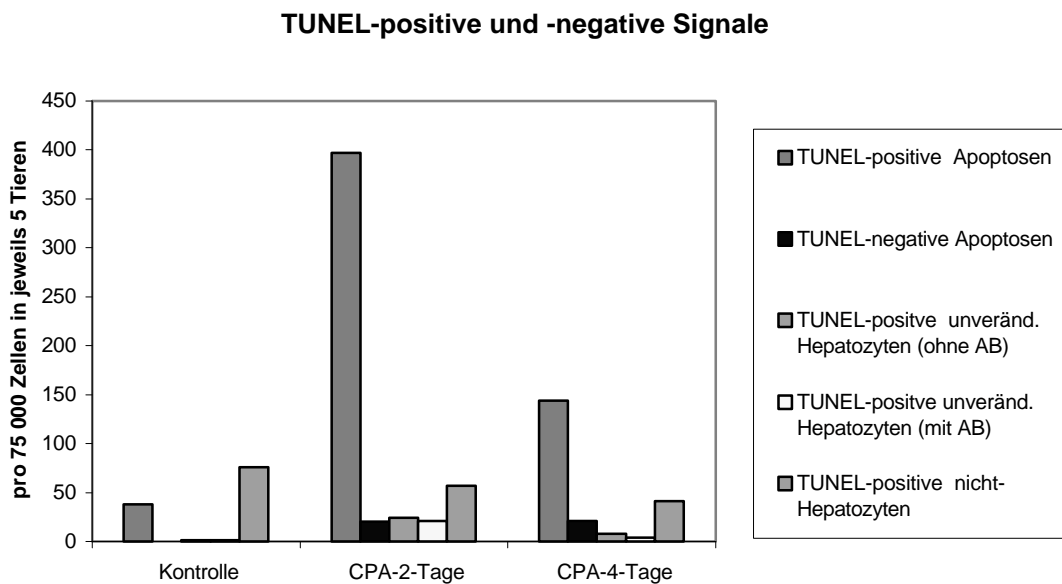


Abb. 16: TUNEL-positive und -negative Signale nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd und 91-tägiger Aufbewahrung in Alkohol

Legende: siehe Abb. 11

Die Anzahl der morphologisch unveränderten, TUNEL-positiven Hepatozyten mit phagozytierten apoptotischen Körperchen im Vergleich zu den positiven Hepatozyten ohne enthaltenen AB war nicht in jeder Versuchstiergruppe gleich hoch. So wurden z.B. in den Lebern der CPA-4-Tage-Gruppe nach einem Tag reiner Fixierung in Formaldehyd mehr als doppelt so viele morphologisch unveränderte, TUNEL-positive Hepatozyten ohne AB im Vergleich zu denen mit AB festgestellt (10 ohne AB zu 4 mit AB) (Tab. 50-55). In der CPA-2-Tage-Gruppe lagen die beiden Typen morphologisch unveränderter Hepatozyten nahezu im Gleichgewicht (20 zu 23). Ebenso wurden über alle Versuchstiergruppen bei den verschiedenen Fixierungsmitteln und -zeiten bezogen auf 100 TUNEL-positive Apoptosen erheblich unterschiedliche Mengen an TUNEL-positiven, morphologisch unveränderten Hepatozyten nachgewiesen. Es lagen etwa 0 bis 21 dieser morphologisch unveränderten, TUNEL-positiven Zellen mit AB und 0 bis 26 TUNEL-positive Zellen ohne phagozytierte AB bezogen auf hundert Apoptosen vor (Tab. 50-55).

Außer den markierten apoptotischen Körperchen und den TUNEL-positiven, morphologisch unveränderten Hepatozyten wurden bei der TUNEL-Methode auch nicht-hepatozelluläre Signale (nicht-Hepatozyten) ermittelt, wobei die Morphologie dieser Zellen, meist Kupfer-Zellen, nicht verändert erschien. Die Abgrenzung dieser Zellen von apoptotischen Hepatozyten bereitete aufgrund ihrer Lage, ihrer ovalen Form sowie der geringen Größe keine Schwierigkeiten. Die Anzahl der positiven

nicht-Hepatozyten, bezogen auf jeweils 75 000 ausgewertete Hepatozyten (jeweils fünf Tiere), schwankte unabhängig von der Versuchstiergruppe zwischen 29 und 118 (siehe auch Tab. 50-55). Eine Abhängigkeit von der Fixierungszeit oder dem Fixierungsmittel war nicht zu erkennen. Es wurden in den Präparaten der Kontrollgruppe mehr nicht-Hepatozyten mit der TUNEL-Methode angefärbt als apoptotische Hepatozyten. In den CPA-2-Tage- und CPA-4-Tage-Gruppen war dies nicht der Fall.

4.3.3.2.3. Apoptose-Indizes mit der TUNEL-Methode

In der folgenden Abbildung 17 werden die geometrischen Mittelwerte der TUNEL-positiven Apoptosen für die drei Versuchstiergruppen separat präsentiert. In die dargestellten Mittelwerte sind auch die weniger intensiv gefärbten apoptotischen Körperchen eingegangen. Nicht enthalten sind die falsch positiven TUNEL-Signale (morphologisch unveränderte, TUNEL-positive Hepatozyten; nicht-hepatozelluläre Signale).

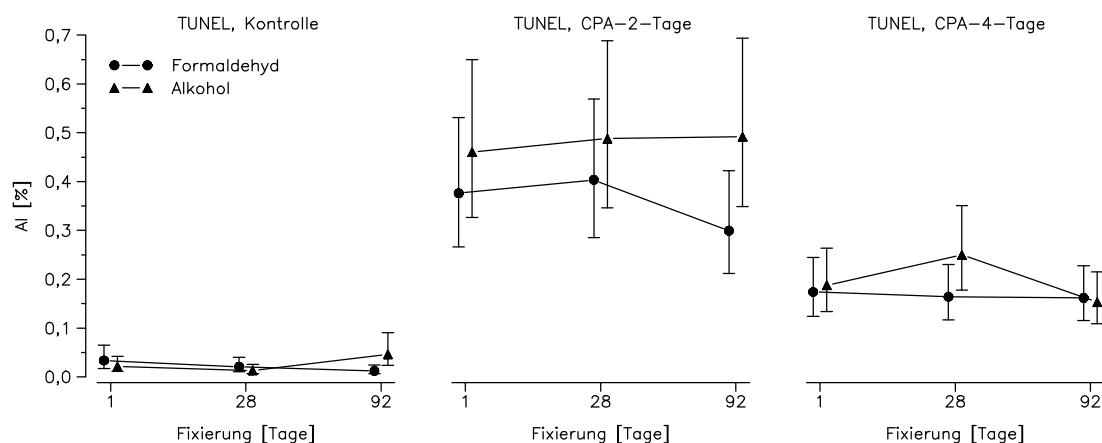


Abb. 17: Vergleich der geometrischen Mittelwerte der mit der TUNEL-Methode ermittelten Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (Kontrolle, CPA-2-Tage, CPA-4-Tage) in den verschiedenen fixierten Präparaten (reine Formaldehyd-, Formaldehyd/Alkohol-Fixierung).

TUNEL – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug ; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; Formaldehyd – reine Fixierung in Formaldehyd; Alkohol – Fixierung für zunächst einen Tag in Formaldehyd, anschließend für 2½, 27 bzw. 91 Tage in 70%igem Ethanol; Fehlerbalken - 95%iger Vertrauensbereich der geometrischen Mittelwerte.

Die Kurven der Apoptose-Indizes (AI) in Abb. 17 haben zu den entsprechenden Standard-H&E-Kurven (siehe Abb. 4) einen annähernd parallelen Verlauf. Durch die gleiche Lokalisation der ausgewerteten Areale in den jeweiligen Serienschnitten,

wurde annähernd die gleiche Anzahl periportal, intermediärer und perivenöser Hepatozyten quantitativ auf das Vorliegen von Apoptosen untersucht. Die AI der TUNEL-Präparate lagen generell über den entsprechenden AI der Standard-H&E-Schnitte.

Analog den Ergebnissen aus der Standard-H&E-Auswertung lagen die Werte der einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben geringfügig höher als die der entsprechenden reinen Formaldehyd-Fixierung. Letztere zeigen im Verlauf der Fixierung aber geringere Schwankungen.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse deckte einen signifikanten Einfluss auf die Apoptose-Indizes durch das Fixierungsmittel bei der CPA-2-Tage-Gruppe ($p < 0,01$) auf. Zusätzlich wurde eine signifikante Wechselwirkung ($p < 0,01$) zwischen dem Einfluss des Fixierungsmittels und der Fixierungszeit in der Kontrollgruppe festgestellt.

4.3.3.3. Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Die Erhebung der fluoreszierenden Apoptosen erfolgte an den Präparaten, die bereits für die standard-lichtmikroskopische Auswertung der mit der alkoholischen H&E-Färbung gefärbten Schnitte herangezogen wurden.

4.3.3.3.1. Nicht-apoptotische fluoreszierende Signale

In den Leberpräparaten wurden neben den apoptotischen Körperchen (AB) vereinzelt intensiv fluoreszierende Hepatozytenkerne sowie komplett leuchtende Leberzellen beobachtet, die keine apoptotische Morphologie aufwiesen. Zudem konnten weitere extra- oder intrazelluläre fluoreszierende Partikel festgestellt werden. Aufgrund ihrer geringeren Fluoreszenzintensität gegenüber den klassischen AB, ihrer meist isolierten Lage sowie einer teilweise unregelmäßigen Form konnten diese Partikel morphologisch nicht der Apoptose zugeordnet werden. Zur Validierung der Fluoreszenzmethode wurden sämtliche Schnittpräparate quantitativ untersucht, um sowohl die Zahl der AB, die mit Standard-Lichtmikroskopie (LM) und Fluoreszenzmikroskopie (FM) detektiert wurden, als auch "falsch positive" Signale zu bestimmen. In der Tabelle 17 wird die Zahl aller AB (FM bzw. LM) und weiterer fluoreszierender Signale (FS) der Versuchstiergruppen und die Summe aus den drei Versuchstiergruppen getrennt dargestellt. Die in Klammern gesetzten Prozentwerte der Spalten "FM+LM" und "LM" geben den Anteil der apoptotischen Zellen und Körperchen an der Summe aller Apoptosen ("FM+LM" + "LM") wieder. In der Spalte "FS" ist in

Klammern der Anteil der nicht der Apoptose zuzuordnenden fluoreszierenden Signale aufgelistet. Der prozentuale Anteil dieser nicht apoptotischen Signale an den insgesamt fluoreszierenden Signalen ("FM+LM" + "FS") ist in Klammern angefügt. Um den Zeitpunkt der abnehmenden Fluoreszenz der AB (siehe Abb. 18) näher eingrenzen zu können, wurden bei dieser Methode zusätzlich die sieben Tage fixierten Proben zur Bestimmung der AI herangezogen.

Tab. 17: Apoptotische Körperchen und Zellen nach Detektion mit dem Standard-Licht- und Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zu weiteren fluoreszierenden Signalen (alkoholische H&E-Färbung).

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe	Apoptotische Zellen und Körperchen pro 75 000 Zellen		Nicht-apoptotische Fluoreszenz pro 75 000 Zellen FS
		FM+LM	LM	
1 Tag	Kontrolle	11 (78,6%)	3 (21,4%)	23 (67,6%)
	CPA-2-Tage	200 (89,7%)	23 (10,3%)	31 (13,4%)
	CPA-4-Tage	104 (80,0%)	26 (20,0%)	9 (8,0%)
	Summe	315 (85,8%)	52 (14,2%)	63 (16,7%)
7 Tage	Kontrolle	7 (88,9%)	0 (11,1%)	4 (33,3%)
	CPA-2-Tage	141 (79,2%)	37 (20,8%)	49 (25,8%)
	CPA-4-Tage	69 (77,5%)	20 (22,5%)	18 (20,7%)
	Summe	218 (79,0%)	58 (21,0%)	71 (24,6%)
28 Tage	Kontrolle	5 (62,5%)	3 (37,5%)	18 (78,3%)
	CPA-2-Tage	120 (69,4%)	53 (30,6%)	25 (17,2%)
	CPA-4-Tage	49 (59,0%)	34 (41,0%)	18 (26,9%)
	Summe	174 (65,9%)	90 (34,1%)	61 (26,0%)
92 Tage	Kontrolle	4 (44,4%)	5 (55,6%)	4 (50,0%)
	CPA-2-Tage	122 (67,0%)	60 (33,0%)	37 (23,3%)
	CPA-4-Tage	47 (47,5%)	52 (52,5%)	14 (23,0%)
	Summe	173 (59,7%)	117 (40,3%)	55 (24,1%)

FM+LM - Spalte enthält die Apoptosen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop (FM) und dem Standard-Lichtmikroskop (LM) erkannt wurden; LM - Spalte enthält die Apoptosen, die ausschließlich mit dem Standard-Lichtmikroskop (LM) erkannt wurden; FS - Spalte enthält fluoreszierende nicht-apoptotische Signale; In den Spalten "LM+FM" und "LM" sind zudem in Klammern der prozentuale Anteil der mit der jeweiligen Methode erkannten AB an der Gesamtmenge der AB dargestellt. Die prozentualen Werte in der Spalte "FS" stellen den Anteil der nicht-apoptotischen fluoreszierenden Signale an allen Fluoreszenzsignalen dar. CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Die überwiegende Zahl (59,7% bis 85,8%) der apoptotischen Körperchen (AB), die mit dem Standard-Lichtmikroskop (LM) erkannt wurden, wiesen gleichfalls eine Fluoreszenz auf. Dementsprechend war ein Teil der AB (14,2% bis 40,3%) ausschließlich im LM sichtbar. Apoptotische Zellen mit den typischen sichel- bzw. halbmondförmigen

gen Chromatinkondensaten waren in jedem Fall nur mit dem Standard-Lichtmikroskop erkennbar. Der Anteil der fluoreszierenden Apoptosen (FM+LM) nahm mit der Fixierungszeit deutlich ab, wohingegen die nur standardlichtmikroskopisch sichtbaren Apoptosen (LM) folglich in ihrem prozentualen Anteil bei längerer Fixierung deutlich anstiegen (von 10,3%-21,4% auf 33,0%-55,6%). Eine genauere Beschreibung der Veränderungen der Apoptose-Indizes, die auf der Auswertung der Eosinfluoreszenz beruhen, kann in Kapitel 4.3.3.3.2. eingesehen werden.

Die im Fluoreszenzmikroskop zusätzlich detektierten Strukturen, bei denen anhand der Standard-Lichtmikroskopie keine Zuordnung zur Apoptose möglich war, machten einen Anteil von 8% bis 78,3% aller fluoreszierenden Signale aus. Hierbei zeigten sich große Schwankungen auch innerhalb der Versuchstiergruppen. Zudem lag keine Korrelation zwischen diesen fluoreszierenden Signalen (FS) und der Anzahl der apoptotischen Körperchen und Zellen (FM+LM) vor. In der Regel fanden sich mehr apoptotische fluoreszierende Signale. Es wurden zum Beispiel in der CPA-4-Tage-Gruppe nach einem Tag Fixierung wesentlich weniger nicht-apoptotische Signale (FS) beobachtet ($104/9 = (FM+LM)/FS$). Hieraus ergibt sich ein Anteil von weniger als 8% nicht-apoptotischer fluoreszierender Signale. Im Gegensatz hierzu wurden in den Leberschnitten der Kontrollgruppe nach 28-tägiger Fixierung mit einem Verhältnis von 5 zu 18 mehr als dreimal so viele nicht-apoptotische als apoptotische Signale festgestellt. Aufgrund dieser Beobachtungen, bei denen keine Gesetzmäßigkeit zu erkennen war, wurden diese Signale bei der Berechnung der Apoptose-Indizes nicht berücksichtigt.

4.3.3.3.2. Apoptose-Indizes mit der Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

In der folgenden Abbildung werden die geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes, die mit der Fluoreszenz-Methode ermittelt wurden, dargestellt. Dies erfolgte zusammen mit den 95%igen Vertrauensintervallen (Fehlerbalken) für die drei Versuchstiergruppen (Kontrolle, CPA-2-Tage und CPA-4-Tage) in Abhängigkeit von der Fixierungszeit.

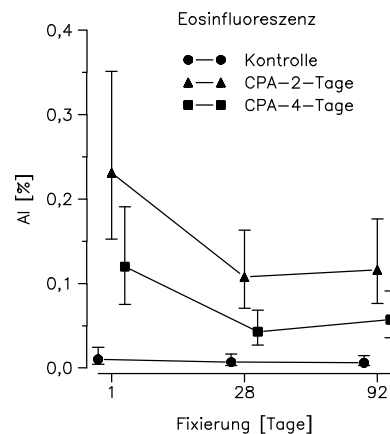


Abb. 18: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen, ermittelt mit der Eosinfloureszenz-Methode an den Carnoy-fixierten Präparaten.

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; Carnoy – Carnoysches Gemisch; Fehlerbalken - 95%iger Vertrauensbereich der geometrischen Mittelwerte.

Wie in Abb. 18 ersichtlich, nahm bei anhaltender Fixierung die Fluoreszenz der apoptotischen Körperchen (AB) ab. Nach zunächst deutlicher Reduzierung der Apoptose-Indizes (AI) in den ersten vier Wochen, war nach weiteren zwei Monaten Fixierung kein zusätzlicher Abfall zu beobachten.

Mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte bei der CPA-2-Tage-Gruppe ein schwach signifikanter ($p < 0,05$) und bei der CPA-4-Tage-Gruppe ein signifikanter ($p < 0,07$) Einfluss durch die Fixierungszeit aufgedeckt werden. Bei der Kontrollgruppe lag eine solche Wechselwirkung nicht vor.

Um den Zeitraum der Fluoreszenzabnahme weiter einzugrenzen, wurden mit der Fluoreszenz-Methode zusätzlich die Präparate nach siebentägiger Fixierung ausgewertet (siehe auch Tab. 17). Diese ergänzenden Daten sind nicht in die statistische Auswertung eingegangen und daher nicht in Abb. 18 dargestellt worden.

Tab. 18: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes in Prozent (Eosinfluoreszenz, alkoholische H&E-Färbung).

Versuchstiergruppe	Fixierungszeit (in Tagen)			
	1	7	28	92
	AI in Prozent			
Kontrolle	0,010	0,008	0,007	0,006
CPA-2-Tage	0,231	0,147	0,108	0,116
CPA-4-Tage	0,120	0,068	0,043	0,057

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AI - Apoptose-Index.

In den Tabellen 57-60 im Anhang können die Einzeltierwerte eingesehen werden

Hieraus ist ersichtlich, dass bereits nach einer Fixierungszeit von sieben Tagen die mit der Fluoreszenz-Methode ermittelten Apoptose-Indizes der CPA-Gruppen um etwa 40% vermindert wurden. Die AI fielen nach weiteren drei Wochen Fixierung erneut um circa 27% bis 37%. Hiernach ist eine Stabilisierung der Fluoreszenz der apoptotischen Körperchen feststellbar.

4.3.4. Anstieg der Apoptose-Indizes nach Cyproteronacetat-Entzug

Zur Darstellung biologischer Effekte von Substanzen werden wie üblich die Kontrollwerte den Daten der Dosisgruppen gegenübergestellt. Zunächst wurde in Tabelle 63 berechnet, um welchen Faktor die Apoptose-Indizes nach der Apoptoseinduktion durch Entzug des Lebermitogens Cyproteronacetat (CPA-Gruppen) über denen der Kontrollgruppe lagen (Anstiegsfaktor). Die geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes der Kontrollgruppe wurden hierfür den AI der beiden CPA-Gruppen (CPA-2-Tage und CPA-4-Tage) gegenüber gestellt. Da die zufälligen Schwankungen der Apoptose-Indizes der Kontrolltiere trotz Datentransformierung erheblich waren, führte dies zu deutlichen Schwankungen der Anstiegsfaktoren. Zur Veranschaulichung dieser Problematik werden im Folgenden einige Apoptose-Indizes nach der Standard-H&E-Färbung und reinen Formaldehyd-Fixierung exemplarisch dargestellt:

Tab. 19: Apoptose-Indizes (geometrische Mittelwerte in Prozent) bei 1 bzw. 92-tägiger Formaldehyd-Fixierung

Fixierungszeit	Versuchstiergruppe		
	Kontrolle	CPA-2-Tage	CPA-4-Tage
1 Tag	0,020	0,246	0,131
92 Tage	0,012	0,281	0,145

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug.

In den Tabellen 26 und 28 im Anhang können die Einzeltierwerte eingesehen werden

Obwohl die Auswertung der Präparate der CPA-Gruppen nach einer Fixierungszeit von 1 bzw. 92 Tagen zu annähernd gleichen geometrischen Mittelwerten geführt hat, ergaben sich durch die zufälligen Schwankungen der Kontrollgruppe für die 92 Tage fixierten Proben doppelt so hohe Anstiegsfaktoren als bei der eintägigen Fixierung (Tab. 63).

Um die Gefahr zu verringern, dass aus diesen Daten falsche Schlüsse über die Spezifität der Methoden für den Apoptosenachweis gezogen werden, wurde aus den beiden Anstiegsfaktoren ein Quotient (AF-2-Tage / AF-4-Tage) errechnet.

Tab. 20: Quotienten der Anstiegsfaktoren AF-2-Tage und AF-4-Tage.

Fixierungsmethode	Färbemethode und Fixierungszeit (in Tagen)	Verhältnis AF-2-Tage / AF-4-Tage
reine Formaldehyd-Fixierung	H&E 1	1,89
	TU 1	2,16
	H&E 28	2,12
	TU 28	2,46
	H&E 92	1,94
	TU 92	1,85
Formaldehyd/Alkohol-Fixierung	H&E 1	1,74
	TU 1	2,65
	H&E 28	1,79
	TU 28	1,95
	H&E 92	3,43
	TU 92	3,21
Carnoy-Fixierung	H&E 1	1,70
	EF 1	1,93
	H&E 28	2,03
	EF 28	2,51
	H&E 92	1,47
	EF 92	2,03

AF-2-Tage bzw. AF-4-Tage – Anstiegsfaktor der Apoptose-Indizes nach 2 bzw. 4 Tagen CPA-Entzug im Vergleich zum Ausgangswert (Kontrollgruppe); AF-2-Tage / AF-4-Tage - Quotient aus den Anstiegsfaktoren; H&E – Standard- bzw. alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung; TU – TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling); EF – Eosinfluoreszenz.

Im Durchschnitt fanden sich in den Lebern der Tiere zwei Tage nach dem Entzug von Cyproteronacetat doppelt so viele Apoptosen wie vier Tage nach dem CPA-Entzug.

Bei den rein Formaldehyd-fixierten Proben wurden selbst bei anhaltender Fixierung nur geringe Schwankungen der Quotienten beobachtet. Somit zeigten die Apoptose-Indizes nach Auswertung der rein in Formaldehyd fixierten Lebern insbesondere nach der Standard-H&E-Färbung eine deutliche Stabilität, die in geringerem Umfang auch bei den Ergebnissen der TUNEL-Methode nach dieser Fixierung noch vorhanden war.

Demgegenüber wiesen die Quotienten der Anstiegsfaktoren der zunächst in Formaldehyd fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben sowohl bei der Standard-H&E- als auch bei der TUNEL-Methode insbesondere bei der längsten Fixierungszeit größere Abweichungen vom Durchschnitt auf.

Die Ergebnisse aus der Auswertung der in Carnoy fixierten Lebern nahmen eine Zwischenstellung ein. Die berechneten Quotienten der Anstiegsfaktoren zeigten insgesamt geringere Schwankungen, als dies bei der Formaldehyd/Alkohol-Fixierung der Fall war.

4.3.5. Apoptose-Indizes mit der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz-Methode im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung)

Die Verwendung von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparaten gilt als Standardmethode zur Quantifizierung und Identifizierung der Apoptose im Gewebeschnitt (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Dies begründet die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus dieser Färbung zu denen der anderen Methoden (TUNEL-Methode, Eosinfluoreszenz) in der folgenden Tabelle (Tab. 21). Es sollte aufgezeigt werden, in welchem Ausmaß die geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes (Tab. 36, 56, 61) von diesem Standard abwichen und ob hierbei konstante Resultate zu beobachten waren.

Tab. 21: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes (AI) mit der TUNEL-Methode (TU) und mit der Eosinfluoreszenz-Methode (EF) im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie (Standard- bzw. alkoholische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)):

Fixierungs- methode	Färbemethode und Fixierungs- zeit (in Tagen)	Kontrolle (H&E-Wert = 100)	CPA-2-Tage (H&E-Wert = 100)	CPA-4-Tage (H&E-Wert = 100)
reine Formaldehyd- Fixierung	H&E 1			
	TU 1	170,00	152,85	132,82
	H&E 28			
	TU 28	175,00	125,86	108,61
	H&E 92			
	TU 92	108,33	106,41	111,72
Formaldehyd/ Alkohol- Fixierung	H&E 1			
	TU 1	146,67	188,26	123,68
	H&E 28			
	TU 28	108,33	144,81	132,99
	H&E 92			
	TU 92	170,37	107,19	114,18
Carnoy- Fixierung	H&E 1			
	EF 1	76,92	89,53	78,95
	H&E 28			
	EF 28	77,78	67,50	54,43
	H&E 92			
	EF 92	60,00	66,67	48,31

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug; H&E – Hämatoxylin-Eosin (Standard-H&E bei den rein Formaldehyd- und den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Präparaten; alkoholisches H&E beim Carnoy-fixiertem Material); TU – TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling); EF – Eosinfluoreszenz.

Mit der TUNEL-Methode wurden prinzipiell mehr apoptotische Zellen und Körperchen detektiert als bei der Standard-H&E-Auswertung. Die TUNEL-Methode wies 6% bis 88% mehr Apoptosen nach als die Standard-H&E-Auswertung.

Der bei den Kontrolltieren beobachtete Unterschied zwischen der TUNEL- und der Standard-H&E-Methode fand sich bei den rein Formaldehyd-fixierten Proben in der Regel nicht in gleicher Relation bei den CPA-behandelten Tieren wieder (Ausnahme: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd). Tendenziell nahm der Unterschied der geometrischen Mittelwerte zwischen den Ergebnissen der TUNEL- und der Standard-H&E-Methode mit der Fixierungszeit ab.

Bei den zunächst Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Proben war zum Zeitpunkt der kürzesten Fixierungszeit die Relation zwischen den Ergebnissen mit der TUNEL-Methode und der Standard-H&E-Färbung auch bei den beiden CPA-Gruppen deutlich unterschiedlich. Hierbei zeigte sich in der CPA-2-Tage-Gruppe im Gegensatz zur CPA-4-Tage-Gruppe eine kontinuierliche Abnahme der Differenz zwischen den ermittelten AI (TUNEL- und Standard-H&E-Methode). Bei den Kontrollgruppen kann durch die zufällige Varianz der niedrigen Daten hierzu keine Aussage getroffen werden.

Bei der Gegenüberstellung der Fluoreszenzmikroskopie und der Standard-Lichtmikroskopie (alkoholische H&E) der Carnoy-fixierten Proben zeigte sich, dass die fluoreszierende Eigenschaft der AB weniger gut für den Nachweis von Apoptosen geeignet ist. Durchschnittlich wurden rund 30% (10% bis 52%) weniger apoptotische Körperchen (AB) am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Ebenso wie bei der TUNEL-Methode wurden mit der Fluoreszenzmikroskopie bei anhaltender Fixierung (bis 28 Tage) im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie nach alkoholischer H&E-Färbung weniger Apoptosen erfasst, als dies nach nur einem Tag Fixierung der Fall war. Eine länger anhaltende Fixierung (92 Tage) reduzierte die fluoreszierende Eigenschaft der AB nicht mehr wesentlich. Die Differenz zwischen den detektierten Zellen bei der standard-licht- und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung fand sich bei den Kontrolltieren und behandelten Gruppen in ähnlicher Form.

4.3.6. Gegenüberstellung der Methoden für den Nachweis der Nekrosen

Um überprüfen zu können, ob die zum Apoptosenachweis eingesetzten Methoden in gleicher Weise nekrotische Zellen detektieren und wie sich in diesem Fall Fixierungsmittel und Fixierungszeit auswirken, erhielten fünf weibliche Ratten einmalig 0,1 ml Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) pro kg Körpergewicht. In den Leberschnitten der Kontrollgruppe wurden keine nekrotischen Zellen festgestellt, hingegen wiesen die mit CCl_4 behandelten Tiere z.B. in der Standard-H&E-Färbung nach einem Tag Fixierung in Formaldehyd einen Nekrose-Index (NI) von 0,4% bis fast 3,5% auf (Tab. 63). Die Daten der Einzeltiere sind im Anhang dargestellt. (Tab. 63-72 (Standard- und alkoholische H&E), Tab. 73-78 (TUNEL-Methode), Tab. 79-82 (Eosinfluoreszenz)).

Die folgende Abbildung (Abb. 19; siehe auch Tab. 83-85) gibt die geometrischen Mittelwerte der Nekrose-Indizes bei den verschiedenen Nachweismethoden Hämatoxylin-Eosin (Standard- und alkoholische H&E), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL) und Eosinfluoreszenz wieder. Die

Zeitangaben der Abszissen beziehen sich auf die Dauer der Fixierung. Bei der Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol wurden die Ergebnisse nach 3,5-tägiger Fixierung graphisch und tabellarisch als 1-Tageswert dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den 95%igen Vertrauensbereich der Mittelwerte.

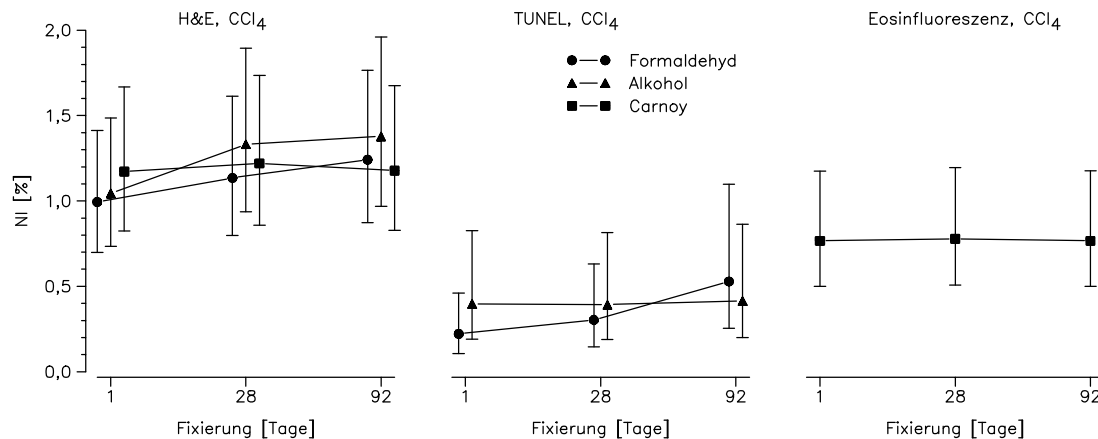


Abb. 19: Gegenüberstellung der geometrischen Mittelwerte der Nekrose-Indizes aus der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz bei drei verschiedenen Fixierungen

H&E – Hämatoxylin-Eosin (Standard-H&E bei reiner Formaldehyd- und bei Formaldehyd/Alkohol-Fixierung, alkoholische H&E bei Carnoy-Fixierung); CCl₄ – Tetrachlorkohlenstoff; TUNEL – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; NI [%] – Nekrose-Index in Prozent; Alkohol – Fixierung für zunächst 1 Tag in Formaldehyd, anschließend 2½, 27 bzw. 91 Tage in 70%igem Ethanol; Carnoy – Carnoysches Gemisch.

4.3.6.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Es ist in der Abb. 19 dargestellt, dass die Nekrose-Indizes (NI) bei Auswertung der H&E-Präparate (Standard- bzw. alkoholische H&E) bei allen Fixierungsarten nahezu identisch waren. Ebenso zeigten die Fehlerbalken der Mittelwerte bei ähnlicher Größenordnung fast deckungsgleiche Anfangs- und Endwerte.

Die geometrischen Mittelwerte, die bei der Auswertung der rein in Formaldehyd fixierten Leberproben erhalten wurden, wiesen dennoch bei länger anhaltender Fixierung eine leicht zunehmende Tendenz auf. Die Differenz zwischen dem Maximum und dem Minimum der NI bei der reinen Formaldehyd-Fixierung betrug 0,25%.

Bei ebenfalls etwas zunehmenden Nekrose-Indizes in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (Differenz: 0,33%) lag die Kurve der zunächst Formaldehyd-fixierten und

anschließend in Alkohol aufbewahrten Organe geringgradig über dem Niveau der in etwa parallel verlaufenden Kurve nach reiner Formaldehyd-Fixierung.

Die NI-Kurve der Mittelwerte der in Carnoy fixierten Gewebeproben (alkoholische H&E-Färbung) wiesen nicht den deutlichen Abfall nach vierwöchiger Fixierung auf, wie es bei den Apoptose-Indizes (Abb. 18) der Fall war. Die Nekrose-Indizes schwankten bei längerer Fixierung um nur etwa 0,04% zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert.

Die statistische Überprüfung der erhaltenen Daten zeigte keine signifikante Beeinflussung der Nekrose-Indizes durch das Fixierungsmittel bzw. die –zeit auf. Zudem ergab sich kein Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Parametern.

4.3.6.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Durch die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (tdT) wurden auch DNS-Strangbrüche in den perivenösen hepatozellulären Nekrosen markiert. Es konnten hierbei punktförmig (granulär) und vollständig TUNEL-positive nekrotische Zellen festgestellt werden, wobei bei Letzteren neben einer granulären Markierung zusätzlich das Zytoplasma schwach angefärbt war. Für die Berechnung der geometrischen Mittelwerte wurden beide Färbetypen berücksichtigt. Besonders gut ließen sich bei dieser Nachweismethode die granulär gefärbten Nekrosen von apoptotischen Zellen differenzieren. Aber auch bei den komplett angefärbten Zellen (granulär und zusätzlich schwach diffus zytoplasmatisch; siehe Kap. 4.3.1.2.) zeigte sich aufgrund der schwachen Zytoplasmafärbung ein deutlicher Unterschied zur Apoptose.

In Abhängigkeit von der Fixierungszeit war bei den rein Formaldehyd-fixierten Lebern – wie es auch schon bei der Standard-Lichtmikroskopie in geringerer Ausprägung beobachtet werden konnte - eine stetige Zunahme der markierten nekrotischen Zellen zu erkennen. Die Differenz zwischen Minimum und Maximum des Nekrose-Index (NI) betrug 0,31%. Dies stand in Kontrast zu den mit der TUNEL-Methode ermittelten Apoptose-Indizes, die mit zunehmender Fixierungszeit entweder konstant blieben oder stetig abnahmen. Bis zu einer Fixierungszeit von einem Monat lagen die NI der rein Formaldehyd-fixierten Proben nach Anwendung der TUNEL-Methode, entsprechend den Standard-H&E-Ergebnissen, unter denen der einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Leberproben. Der Mittelwert war anschließend nach 92-tägiger Fixierung bei reiner Formaldehyd-Fixierung deutlich höher als der Wert bei den Proben, die anschließend in Alkohol aufbewahrt wurden.

Dennoch zeigten die Vertrauensintervalle der beiden NI-Kurven eine deutliche Überlappung.

Bei den NI-Kurven des zunächst einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Materials wurden breitere 95%ige Vertrauensintervalle gegenüber der reinen Formaldehyd-Fixierung erhalten. Durch die geringe Differenz der geometrischen Mittelwerte der Nekrose-Indizes (0,02%) bei den nach Formaldehyd-Fixierung in Alkohol aufbewahrten Lebern, verlief diese Kurve zu der Abszisse nahezu parallel. Ein ähnlicher Verlauf liegt bei den Kurven der Apoptose-Indizes bei der CPA-2-Tage-Gruppe vor, während die AI-Kurve der CPA-4-Tage-Gruppe nach einem Anstieg auf den 28-Tage-Wert bis zum 92. Fixierungstag abfällt, also sich von den NI-Kurven abweichend verhält.

Die statistische Auswertung der Daten stellte bei dieser Nachweismethode ebenso wie bei den Daten der Standard-H&E-Färbung keine signifikanten Änderungen des Färbeverhaltens der Nekrosen in Abhängigkeit von dem Fixierungsmittel oder der Fixierungszeit fest. Eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Parametern konnte gleichfalls nicht aufgezeigt werden.

4.3.6.3. Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische H&E-Färbung)

Ebenso wie mit der TUNEL-Methode wurden auch anhand der Eosinfluoreszenz nicht nur apoptotische, sondern auch nekrotische Zellen erfasst.

Bei Auszählung der nekrotischen Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigte der Kurvenverlauf der geometrischen Mittelwerte der Nekrose-Indizes (Abb. 19) keine Abhängigkeit von der Fixierungszeit. Allerdings lagen mit einem Wert von etwa 0,7 große Vertrauensintervalle der Mittelwerte vor. Die Differenz von Minimum und Maximum ergab bei gerundeten Daten einen Wert von nur etwa 0,01%. Dies entspricht nicht dem Verlauf der Kurven nach Bestimmung der Apoptose-Indizes, bei welchen in dem Zeitraum zwischen 1 und 28 Tagen Fixierung eine deutliche Abnahme der Eosinfluoreszenz zu beobachten war.

Bei der statistischen Auswertung konnten bei den NI wie schon bei der H&E- (Standard- und alkoholische H&E-Färbung) und der TUNEL-Methode (Kap. 4.3.6.1. und 4.3.6.2.) keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte in Abhängigkeit von der Fixierungszeit aufgezeigt werden.

Aus der Abb. 19 ist ersichtlich, dass sowohl mit der TUNEL-Methode als auch mit der Eosinfluoreszenz-Methode nicht nur apoptotische Zellen und Körperchen, sondern auch ein erheblicher Teil der nekrotischen Zellen erfasst werden. Das grup-

penweise Auftreten der Nekrosen, die Morphologie der nekrotischen Zelle und auch das Vorhandensein von Entzündungszellen erleichterten meist die Unterscheidung von der Apoptose. Zusätzlich konnte in der Regel bei den nekrotischen Zellen ein deutlich schwächeres TUNEL- bzw. Fluoreszenzsignal (siehe Kap. 4.3.1.2. und 4.3.1.3.) als Unterscheidungskriterium herangezogen werden.

4.3.6.4. Nekrose-Indizes mit der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz-Methode im Vergleich zur Standard-Lichtmikroskopie (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung)

Es sollte bestimmt werden, in welchem Ausmaß die im H&E-Präparat (Standard- und alkoholische H&E) mit dem Standard-Lichtmikroskop identifizierten Nekrosen mit der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz-Methode erfasst wurden. Hierfür wurde der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven und der fluoreszierenden Nekrosen im Vergleich zu den im H&E-Schnitt (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung) identifizierten Nekrosen errechnet und tabellarisch dargestellt (Tab. 22). Die zugrunde liegenden geometrischen Mittelwerte können aus der Abbildung 19 und den Tabellen 83-85 im Anhang entnommen werden.

Tab. 22: Prozentualer Anteil der TUNEL-positiven und fluoreszierenden Nekrosen bezogen auf die NI der Standard-H&E- bzw. alkoholischen H&E-Färbung.

Fixierungsmittel	Methode Fixierungszeit (in Tagen)	NI im Vergleich zu H&E (in Prozent) (H&E-Wert = 100)
reine Formaldehyd-Fixierung	H&E 1	22,33
	TU 1	
	H&E 28	26,78
	TU 28	
	H&E 92	42,51
	TU 92	
Formaldehyd/Alkohol- Fixierung	H&E 1	37,99
	TU 1	
	H&E 28	29,50
	TU 28	
	H&E 92	30,12
	TU 92	
Carnoy-Fixierung	H&E 1	65,39
	EF 1	
	H&E 28	63,80
	EF 28	
	H&E 92	65,11
	EF 92	

NI - Nekrose-Index; H&E – Hämatoxylin-Eosin (Standard-H&E bei den rein Formaldehyd- und den zunächst einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Präparaten; alkoholisches H&E beim Carnoy-fixiertem Material); TU – TUNEL-Methode (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling); EF – Eosinfluoreszenz; Carnoy - Carnoysches Gemisch

In der Tabelle 22 ist zu erkennen, dass etwa 22% bis 42% der nekrotischen Zellen mit der TUNEL-Methode bei den rein Formaldehyd-fixierten Leberpräparaten markiert wurden. Der Anteil TUNEL-positiver Nekrosen stieg hierbei im Verlauf der Fixierungszeit auf fast das Doppelte an.

Im Gegensatz hierzu war bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben ein Abfall der Differenz der NI zwischen der TUNEL- und der Standard-H&E-Methode von etwa 38% auf circa 30% zu erkennen. Diese Abnahme ereignete sich innerhalb der ersten vier Wochen Fixierung, während bis zum Ende der Untersuchung keine weiteren Veränderungen auftraten.

Der Prozentsatz der mit der Eosinfluoreszenz nachweisbaren Nekrosen lag durchschnittlich bei 64% und veränderte sich mit der Fixierungszeit nicht. Dies stand im Gegensatz zu der mit der Fixierungszeit abnehmenden Fluoreszenz der apoptotischen Körperchen (Abb. 18 und Tab. 18).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sowohl bei der TUNEL-Methode als auch bei der Eosinfluoreszenz-Methode zur Differenzierung der Apoptosen von nekrotischen Zellen, nicht-hepatozellulären und unspezifischen Signalen eine zusätzliche morphologische Kontrolle notwendig ist. Darüber hinaus wurde bei der TUNEL-Methode und in größerem Ausmaß mit Hilfe der Eosinfluoreszenz ein Teil der Apoptosen nicht erfasst.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst spezifische und sensitive sowie einfach und schnell durchzuführende Nachweismethode für apoptotische Zellen und Körperchen an Leberpräparaten zu ermitteln. Die Nachweismethoden wurden an unterschiedlich lange fixiertem Material angewandt, um zu eruieren, inwieweit sie auch an archiviertem Nassmaterial eingesetzt werden können. Den drei Nachweismethoden, die aus dem Spektrum der in Publikationen beschriebenen Nachweismethoden ausgewählt wurden, liegt die Identifizierung der apoptotischen Zellen und Körperchen anhand von drei verschiedenen Charakteristika der Apoptose zugrunde:

- a) Morphologie (Standard-H&E- und alkoholische H&E-Färbung)
- b) Internukleosomale DNS-Fragmentierung (TUNEL-Methode)
- c) Verstärkte Eosinophilie und die hierauf beruhende Eosinfluoreszenz der apoptotischen Zellen und Körperchen.

Die im Rahmen der Standard-H&E- und alkoholischen H&E-Färbung erhaltenen Apoptose-Indizes (AI) wiesen nur geringe Schwankungen auf. Dies trifft für alle drei gewählten Fixierungszeiten zu und galt insbesondere für die rein in Formaldehyd und die in Carnoy fixierten Leberpräparate.

Die AI bei Anwendung der TUNEL-Methode lagen auf einem höheren Niveau als die der anderen Methoden, wiesen aber größere 95%ige Vertrauensbereiche der Mittelwerte auf. Hierbei erschienen die Ergebnisse der Auswertung nach der reinen Formaldehyd-Fixierung zu den verschiedenen Fixierungszeiten stabiler, als die der Lebern, die kurzzeitig (1 Tag) in Formaldehyd fixiert und anschließend in Alkohol aufbewahrt wurden (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung). Allerdings lagen die Werte nach der erstgenannten Fixierungsart (reine Formaldehyd-Fixierung) durchschnittlich insgesamt niedriger.

Die Nutzung der Eosinfluoreszenz ergab nur wenig streuende AI, die allerdings bereits nach einem Tag Fixierung geringfügig unter denen der anderen beiden Nachweissysteme (TUNEL-Methode, Standard-H&E) lagen. Aus zunehmender Fixierungszeit resultierte eine weitere Abnahme der Nachweisbarkeit apoptotischer Körperchen mittels der Eosinfluoreszenz-Methode.

5.1. Adaptation der Versuchstiere an einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus bei kontrollierter Fütterung

Bei Kontrollwerten im Promillebereich ist es im Sinne solider Daten wünschenswert, im Rahmen der einzelnen Nachweissysteme möglichst hohe Apoptose-Indizes in den Lebern der Kontrolltiere zu erhalten.

Der Zelluntergang durch Apoptose ist ebenso wie die Leberzellproliferation von zirkadianen Schwankungen bestimmt. Beide Phänomene werden dabei eklatant von der Fütterung der Tiere beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Apoptoseraten bei Fütterung während der Dunkelphase auftreten und kurz vor der Futteraufnahme am Ende der Hellphase ein Apoptose-Peak zu erwarten ist (LAUER, 1985; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; BURSCH et al., 1994; GRASL-KRAUPP et al., 1994). Eine kalorienreduzierte Diät hat einen langfristig stimulierenden Effekt auf den AI der Leber zur Folge (SCHULTE-HERMANN et al., 1988; GRASL-KRAUPP et al., 1994; KOLAJA et al., 1996). Der Maximalwert der Zellproliferation tritt etwa zwölf Stunden nach dem Apoptose-Peak auf (BURSCH et al., 1994). Um in der vorliegenden Arbeit ebenfalls den Einfluss von Fütterung und Tag-Nacht-Rhythmus zur Steigerung der Apoptoserate bei den Kontrollen zu nutzen, wurden sämtliche Tiere an einen umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus adaptiert. Zudem erhielten sie Futter über einen begrenzten Zeitraum am Anfang der Dunkelheit und wurden nach dieser partiellen Synchronisation am Ende der Lichtphase circa eine Stunde vor Beginn der Fütterung getötet.

Der Aspekt der gegenläufigen Beeinflussung von Zellproliferation und -untergang in Abhängigkeit von der Fütterung und dem Lichtregime muss auch bei vergleichenden Beurteilungen von Studienergebnissen beachtet werden.

5.2. Auswertungsstrategien

Grundvoraussetzung für eine Bewertung der verschiedenen Datengruppen (Apoptose- (AI) und Nekrose-Indizes (NI)) war eine möglichst objektive Erhebung der AI bzw. NI, um ausschließlich die Effekte der Nachweismethoden auf die AI und NI sowie ihre Beeinflussung durch die Wahl des Fixierungsmittels und der Fixierungsdauer zu erhalten. Hierfür wurde eine große Anzahl an Hepatozyten pro Leberlappen (jeweils 15 000) ausgezählt, um auch bei niedrigen Kontrollwerten stabile Daten zu erhalten. Wenngleich seit einiger Zeit in Anlehnung an das Leberazinus-Schema von RAPPAPORT et al. (1954) vermehrt die zonale Auswertung mittels des "lobule-dependent zonal measurement" (LZM) für die Auswertung von Leberpräparaten in Routinestudien herangezogen wird (BAHNEMANN und MELLERT, 1997), erschien diese Auswertungsstrategie hierfür wenig geeignet. Zum einen werden beim LZM vorbestimmte Anforderungen an die gewählten Messfelder (definierter Abstand der abführenden Vene vom Portalfeld, Größenbeschränkung der Gefäßbereiche) gestellt, zum anderen wird hierdurch die Anzahl der auswertbaren Messfelder pro Leberlappen beschränkt. Weiterhin kann eine gewisse subjektive Beeinflussung der

Daten nicht vollständig ausgeschlossen werden, auch wenn die Auswahl der Messfelder (Leberazinus) repräsentativ erfolgt.

Daher wurde für die Bestimmung der Apoptose- und Nekrose-Indizes in der vorliegenden Studie drei senkrecht zum größten Querdurchmesser des Leberlappens verlaufende Streifen (jeweils 5 000 Zellen) meanderförmig durchgemustert. Hieraus wurden anschließend die Apoptose-Indizes der Einzeltiere berechnet (Anzahl der Apoptosen bezogen auf die Gesamtzellzahl von 15 000 Zellen).

5.3. Vergleich der ermittelten Apoptose-Indizes

5.3.1. Apoptose-Indizes bei den Kontrollen

5.3.1.1. Apoptose-Indizes der Einzeltiere

Bei den Kontrolltieren wurden nach einem Tag Formaldehyd-Fixierung (Routinefixierung) und Standard-H&E-Färbung mit einer rechtsschiefen Verteilung Apoptose-Indizes von 0,013% bis 0,033% festgestellt. Ähnliche Werte fanden sich auch bei den beiden anderen Fixierungstypen, einen Tag Formaldehyd-Fixierung mit anschließender Aufbewahrung in Alkohol (0,007%-0,027%) und Carnoy-Fixierung (0,007%-0,06 %). Bei ausschließlicher Erfassung der chromatinhaltigen apoptotischen Körperchen (AB) lagen die Werte mit 0,0%-0,027% (reine Formaldehyd-Fixierung), 0,0% bis 0,02% (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung) bzw. 0,007% bis 0,033% (Carnoy-Fixierung) geringfügig unter den Werten bei Ermittlung der AB-Gesamtmenge (AB mit und ohne Chromatin).

5.3.1.2. Vergleich mit den Daten aus der Literatur

Durchweg rangieren die hier erhaltenen geometrischen Mittelwerte im untersten Bereich der Daten anderer Studien (BURSCH et al., 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a; GOLDSWORTHY et al., 1996b).

Die in der Literatur beschriebenen Apoptose-Indizes der Leber unbehandelter Ratten weisen eine erhebliche Spannweite auf. Es werden Daten wie z.B. 0-2 Apoptosen pro 2 000-3 000 intakte Leberzellen angegeben, was einem Apoptose-Index (AI) von 0%-0,1% entspricht (BURSCH et al., 1990). Bei ausschließlicher Auszählung der chromatinhaltigen apoptotischen Körperchen (AB) wurden Apoptose-Indizes von Kontrolltieren (siehe auch Tab. 23) von $0,05\% \pm 0,05$ und $0,02\% \pm 0,03$ ermittelt und bei Einbeziehung aller AB (mit und ohne Chromatin) $0,09\% \pm 0,09$ und $0,02\% \pm 0,03$ (BURSCH et al., 1986).

Erklärungen für die leicht abweichenden Ergebnisse können nur teilweise gefunden werden. Es muss zum Beispiel berücksichtigt werden, dass etwa 30% bzw. 50% der apoptotischen Körperchen chromatinhaltig sind (BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Somit entspräche der AI von 0,05% bei der theoretischen Umrechnung auf die Gesamtmenge (AB mit und ohne Chromatin) etwa einem AI von 0,16% bzw. 0,1%. In dem ersten Unterversuch wurde dies durch die Auswertung von BURSCH et al. (1986) bestätigt, im zweiten Unterversuch der Autoren traf dies jedoch nicht zu. Außerdem ist ein direkter Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten nicht möglich, da in der genannten Studie (BURSCH et al., 1986) jedes einzelne AB gewertet wurde und berücksichtigt werden muss, dass eine Leberzelle zu etwa 80% in 2-4 apoptotische Körperchen zerfällt (BURSCH et al., 1985; CONSTAN et al., 1996; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Wird dieser Aspekt beachtet, scheint eine bessere Korrelation unserer Daten mit denen der Literatur zu bestehen. Eine Abhängigkeit der AI von den Rattenstämmen ist unbekannt, da nur wenige Vergleichsdaten existieren. So wurden die Apoptose-Indizes bei etwa sieben Wochen alten Alderly-Park-Ratten sowie sechs Wochen alten Sprague Dawley-Ratten mit $0,1\% \pm 0,09$ (MAYOL et al., 1992; WHEELDON et al., 1995) und die von B6C3F1-Mäusen mit 0,01%-0,1% angegeben (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Demgegenüber wurden in der vorliegenden Arbeit 57 Tage alte Wistar-Ratten eingesetzt.

Die Streuung der Daten ist vermutlich auf die individuelle Variation des AI zurückzuführen. Eventuell spielt auch die unterschiedliche Zellzahl bei der Auswertung eine Rolle. GOLDSWORTHY et al. (1996a, b) erhoben ihre Daten auf der Grundlage von 2 000-4 000 Zellen, wohingegen in der vorliegenden Arbeit 15 000 Leberzellen ausgewertet wurden. Wenngleich die hier vorliegenden Daten somit vertrauensvoller erscheinen, können die Apoptose-Indizes nicht durch alleinige Erhöhung der Zellzahlen stabilisiert werden. Unter Beachtung der individuellen Schwankungen werden bei höheren Tierzahlen pro Behandlungsgruppe konstantere Durchschnittswerte erhalten, als durch die Auswertung von zusätzlichen Zählfeldern in einer kleineren Tiergruppe (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Abweichend hiervon sind MI et al. (2000) der Meinung, dass eine höhere Genauigkeit und Effizienz bei der Quantifizierung der Apoptose nach Auswertung größerer Zellzahlen pro Leberschnitt gegeben ist. Da in der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Darstellung der Nachweissysteme das primäre Ziel darstellte, war von größerer Wichtigkeit, dass die einzelnen Tiere möglichst stabile Apoptose-Indizes aufwiesen.

5.3.2. Apoptose-Indizes bei den Dosisgruppen (CPA-2-Tage- und CPA-4-Tage-Gruppe)

5.3.2.1. Apoptose-Indizes der Einzeltiere

Da die Apoptose-Indizes (AI) bei den unbehandelten Ratten für eine Gegenüberstellung der Nachweissysteme zu niedrig waren, wurde ein Induktionsmodell verwandt.

Die Tiere erhielten über sieben Tage das Hepatomitogen Cyproteronacetat (CPA); zwei und vier Tage nach der letzten Dosis wurden sie getötet. Zu diesem Zeitpunkt wird ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate beschrieben (BURSCH et al., 1984; 1985; LAUER, 1985; BURSCH et al., 1986; SCHULTE-HERMANN et al., 1988; ROBERTS et al., 1995).

Ebenso wie bei den Kontrolltieren zeigten sich bei den mit CPA behandelten Tieren große individuelle Schwankungen der AI. Die Einzeltierwerte (Standard-H&E, einen Tag reine Formaldehyd-Fixierung) bewegten sich zwischen 0,093% und 0,680% (CPA-2-Tage) bzw. 0,053% und 0,487% (CPA-4-Tage). Aufgrund der sich überlappenden Daten war anhand der Apoptose-Indizes allein keine sichere Zuordnung der einzelnen Tiere zu einer der beiden Gruppen möglich. Die bei den beiden Tieren 12 und 14 erhaltenen sehr niedrigen AI (0,053% bzw. 0,067% bei 1 Tag reiner Formaldehyd-Fixierung, Standard-H&E-Färbung) zeigen sich kontinuierlich bei allen Nachweismethoden und Fixierungen. Die Konstanz der Ergebnisse spricht für die Zuverlässigkeit der Methode, welche somit einen verlässlichen Vergleich der Nachweissysteme nach Anwendung verschiedener Fixierungsmittel über verschiedenen lange Fixierungszeiten erlaubt.

Folgende Aspekte könnten als Einflussfaktoren auf die Höhe der AI eine Rolle gespielt haben:

- a) Unterschiedliche individuelle Empfindlichkeit der einzelnen Tiere gegenüber CPA.
- b) Variierende Abbaugeschwindigkeit der apoptotischen Körperchen infolge einer uneinheitlichen Enzymausstattung der Hepatozyten, was eine individuelle Akkumulation der AB oder aber eine schnellere Elimination bewirken könnte. Dieser Überlegung widerspricht allerdings die Feststellung, dass nicht nur bei unveränderten und präneoplastischen Hepatozyten sondern auch bei Mäuseenterozyten nach radioaktiver Bestrahlung die Abbaugeschwindigkeit apoptotischer Körperchen unverändert einheitlich zwei bis drei Stunden beträgt (POTTEN et al., 1978; WYLLIE et al., 1980; IJIRI und POTTEN, 1983; BURSCH et al., 1990; 1992; SCHULTE-HERMANN et al., 1995a, b). Auch die beschriebene Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit vom Tieralter (STINCHCOMBE, 1996) kann im vorliegen-

den Versuch mit gleichaltrigen Ratten diese unterschiedlichen AI nicht verursacht haben.

- c) Nicht erkannte exogene Einflussfaktoren auf die Apoptoserate und deren Abbau-geschwindigkeit bei Einzeltieren, wie z.B. Stress, Infektionen oder andere Erkrank-ungen. Das Vorliegen von Erkrankungen kann aufgrund der täglichen klinischen Untersuchung ausgeschlossen werden, nicht dagegen eine individuell unter-schiedliche Stressempfindlichkeit der Tiere gegenüber dem täglichen Handling.

5.3.2.2. Vergleich mit den Daten aus der Literatur

Dem oben genannten Induktionsmodell entsprechend wurden von BURSCH et al. (1984; 1985; 1986) und GRASL-KRAUPP et al. (1995) folgende Apoptose-Indizes beobachtet:

Tab. 23: Gegenüberstellung der Apoptose-Indizes (arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung) verschiedener Publikationen von BURSCH et al. (1984; 1985; 1986) bzw. GRASL-KRAUPP et al. (1995):

Versuchs- tiergruppe	AI [%]		AF		Zitate
	Total (AB mit und ohne Chroma- tin)	AB mit sichtba- rem Chromatin	Total (AB mit und ohne Chroma- tin)	AB mit sichtba- rem Chromatin	
Kontrolle	0,1 ^a	n.d.			BURSCH et al., 1985
CPA-2-Tage	4,0 ^a	1,5 ^a	40	n.d.	
CPA-4-Tage	1,0 ^a	0,4 ^a	11	n.d.	
Kontrolle	0,02 ± 0,01	^b			BURSCH et al., 1985
CPA-2-Tage	4,1 ± 2,2	1,34 ± 0,76	205	159,5	
CPA-4-Tage	1,1 ± 0,7	0,44 ± 0,31	55	52,4	
Kontrolle	0,09 ± 0,09	0,05 ± 0,05			BURSCH et al., 1986
	0,02 ± 0,03 ^c	0,02 ± 0,03 ^c	n.d.	n.d.	
CPA-2-Tage	2,32 ± 0,86	1,7 ± 0,55	25,8	34	
	2,70 ± 0,85 ^c	1,04 ± 0,55 ^c	135	52	
Kontrolle	0,024 ^a	n.d.			GRASL-KRAUPP et al., 1995
CPA-2-Tage	0,92 ^a	0,5 ^a	38,3	n.d.	

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage – vier Tage CPA-Entzug; AI [%] – Apoptose-Index in Prozent; AF - Anstiegsfaktor (AI der CPA-2-Tage bzw. CPA-4-Tage-Gruppe/Kontrollwert); AB – apoptotische Körperchen; n.d. – nicht durchgeführt; a - Diese Daten wurde aus einer Graphik abgelesen; b - 1 AB auf 11 900 Hepatozyten; c - 2. Experiment mit identi-schem Versuchsaufbau

Die Auswertungen (Tab. 23) wurden an Material durchgeführt, das einen Tag in Carnoy fixiert und anschließend mit H&E gefärbt wurde. Als Basis dienten 1 500-4 000 (BURSCH et al., 1984; GRASL-KRAUPP et al., 1995) bzw. 2 500-3 000 Leberzellen (BURSCH et al., 1985; 1986).

Die vorliegenden Daten entsprachen trotz gleichartigem Versuchsaufbau keinem der von BURSCH et al. (1984*; 1985**; 1986***) und GRASL-KRAUPP et al. (1995****) ermittelten Ergebnisse und zusätzlich wichen die erzielten Werte aus den Arbeiten in den Jahren 1986 und 1995 erheblich von den früheren Versuchen der gleichen Autoren ab.

Selbst das Tier (Nr. 6) aus unserem Versuch mit dem höchsten Apoptose-Index (0,68%) zeigte einen deutlich niedrigeren AI als die Tiere in den genannten Publikationen. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus den Publikationen mit unseren ermittelten Daten ist daher nicht möglich, was u.a. folgende Gründe haben könnte:

- a) Von BURSCH et al. (1984; 1985; 1986) und GRASL-KRAUPP et al. (1995) wurde jedes apoptotische Körperchen einzeln gezählt, von uns aber in Gruppen zusammen liegende AB als ein einziges Ereignis aufgelistet wurde (siehe Kap. 5.3.1.2.). Aber auch bei der theoretischen Umrechnung, wenn von einem Zerfall von 80% der Leberzellen in 2-4 AB ausgegangen wird (BURSCH et al., 1985; CONSTAN et al., 1996; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b), entsprechen die vorliegenden Daten nicht den Werten aus den Studien von 1984 und 1985 der genannten Arbeitsgruppen.
- b) In der Studie von GRASL-KRAUPP et al. (1995), die aus der gleichen Arbeitsgruppe stammen wie die Publikationen von BURSCH et al. (1984; 1985; 1986), wurde die Tötung der Wistar-Ratten statt am Ende der Lichtphase am Ende der Nachtphase (Standardbedingungen), der Zeitspanne mit dem Apoptose-Minimum (SCHULTE-HERMANN et al., 1988; BURSCH et al., 1994), durchgeführt.

Dennoch ist die drastische Reduktion der Apoptose-Indizes in den aufeinanderfolgenden Studien dieser Arbeitsgruppe erstaunlich. Erklärungen werden von den Autoren nicht genannt und sind aus dem Versuchsaufbau mit einer Ausnahme (siehe b) nicht ersichtlich. Neben den bereits unter Kap. 5.3.2.1. a-c genannten Aspekte könnten die abfallenden Apoptose-Indizes durch folgende Aspekte ausgelöst worden sein:

- c) Personenbezogenen Faktoren in der Auswertung
- d) Eine veränderte Empfindlichkeit der Tierstämme gegenüber CPA. Wenngleich dies aufgrund fehlender Untersuchungen bei verschiedenen Rattenstämmen nicht beurteilt werden kann, wurden zumindest nach Mitogen-Applikation bei Proliferationswerten von Sprague Dawley-Ratten 2,3-fach und bei Fischer-Ratten (F

344) 6,6-fach höhere Werte erhalten, als in den Lebern der bei unserem Versuch verwandten Wistar-Ratten (BAHNEMANN, 1999, persönliche Mitteilung).

e) Wechselnde Futtersorten

Allerdings bieten diese Punkte keine Erklärungen für die unterschiedlichen Anstiegsfaktoren (AF) und Quotienten der Anstiegsfaktoren der beiden Dosisgruppen (Quotient aus AF von CPA-2-Tage und CPA-4-Tage). Die von uns bestimmte Zunahme der Apoptose-Indizes (Anstiegsfaktor, AF) um den Faktor 12,2 (CPA-2-Tage) und 6,4 (CPA-4-Tage) bezogen auf die Kontrollen (siehe Tab. 62) ergaben einen Quotienten (AF-2-Tage/AF-4-Tage) von 1,89 (Formaldehyd-Fixierung, Standard-H&E) (siehe Tab. 20). Dieser Wert liegt deutlich unter den Quotienten 3,64 bzw. 3,73 aus den Untersuchungen von BURSCH et al. (1984; 1985).

5.4. Nachweismethoden der Apoptose

Hauptaufgabe dieser Arbeit sollte die Identifizierung eines Nachweissystems und einer Messstrategie sein, um zuverlässig, schnell und preiswert Routinestudien in der Toxikopathologie am Schnittpräparat auswerten zu können. Dafür sollte gewährleistet sein, dass das System spezifisch ist, also zuverlässig nur Apoptosen detektiert und andere, speziell nekrotische Zellen nur in einem zu vernachlässigendem Ausmaß erfasst. Um ferner in zukünftigen Studien Aussagen über Substanzeffekte treffen zu können, war ein möglichst hoher Apoptose-Index auch bei Kontrollen erwünscht (WIJSMAN et al., 1993; GOLDSWORTHY et al., 1996b). Dies kann durch eine Erweiterung des sichtbaren Zeitfensters der Apoptose, z.B. durch zusätzliches Erfassen präapoptotischer Zellen oder eine höhere Sensitivität erreicht werden. Zudem sollte die Nachweismethode schnell zu erlernen und durchzuführen sein, so dass auch weniger qualifizierte Personen diese Messungen durchführen können. Eine Adaptation an ein rechnergestütztes Bildanalysesystem würde diesen Kriterien entsprechen.

Für die ursprüngliche Definition der Apoptose wurden morphologische Kriterien verwandt (KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Die H&E-Diagnostik (Standard-H&E-Färbung) stellt zum Nachweis der Apoptose derzeit die Standardmethode dar (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Mittels dieser Methode kann die Apoptose in der Regel von der Nekrose unterschieden werden (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Dennoch erschwerte die im Standard-Lichtmikroskop nicht immer zu beobachtende Zunahme der Eosinophilie eine schnelle Erfassung der apoptotischen Zellen und Körperchen, so dass bei relativ hoher Vergrößerung (400x) gearbeitet werden musste.

Desweiteren wurde festgestellt, dass man sich die zunehmende Eosinophile der AB in der Fluoreszenzmikroskopie für den Nachweis der Apoptose zu Nutze machen kann (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996). Da dieser Farbstoff eine Eigenfluoreszenz besitzt, wird ein schnelleres Auffinden der Apoptosen ermöglicht und zudem sollen auch kleine, im Standard-Lichtmikroskop nicht sichtbare AB erkannt werden. Stark chromatinhaltige AB werden durch die Maskierung der Fluoreszenz weniger gut erfasst (STINCHCOMBE, 1996).

Mit Einführung des Enzym-vermittelten Einbaus von markierten Nukleotiden an die Enden der bei der Apoptose entstehenden DNS-Strangbrüche mittels der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (tdT) (TUNEL-Methode) wurde eine weitere Methode zur Anwendung an Formaldehyd-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Gewebe ermöglicht. Im Vergleich zur elektrischen Auftrennung der aus den Zellen isolierten DNS-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese (AGE)(ARENDS et al., 1990; OBERHAMMER et al., 1991; ALISON und SARRAF, 1995; DONG et al., 1997), können die apoptotischen Zellen und Körperchen nun auf der Einzelzellbasis identifiziert werden und die topographische Lage der AB im Gewebe sowie der betroffene Zelltyp bestimmt werden (GOLD et al., 1993; FEHSEL et al., 1994; CONSTAN et al., 1996; VALENTE et al., 1998). Wenn mit dem Nachweis der DNS-Fragmente auch präapoptotische Zellen markiert werden, wie einige Autoren annehmen, muss eine Vergrößerung des sichtbaren Zeitfensters gegenüber der Standard-H&E-Lichtmikroskopie berücksichtigt werden (KONG und RINGER, 1995; DONG et al., 1997; OYAIZU et al., 1997; ZHAO et al., 1997). In der Tumordiagnostik bietet die TUNEL-Methode einen großen Vorteil, da aufgrund der polymorphen Kerne in den veränderten Geweben die Erkennung der Apoptosen im Standard-H&E-Schnitt ein sehr großes Erfahrungspotential voraussetzt und eine subjektive Interpretation nicht zu vermeiden ist (ANSARI et al., 1993). Dies trifft nach den Erfahrungen dieser Studie vielmehr noch auf die mit der alkoholischen H&E-Färbung angefertigten und somit schwach gefärbten Präparate zu. In jedem Fall wird eine leichtere und schnellere Identifizierung der apoptotischen Zellen und Körperchen ermöglicht (WIJSMAN et al., 1993; GOLDSWORTHY et al., 1996b).

Die Eosinfluoreszenz, die TUNEL-Methode und die Standard-H&E-Färbung werden im Folgenden zunächst separat diskutiert.

5.4.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Die Standard-H&E-Färbung gilt derzeit als Standardmethode für den Nachweis der Apoptose und basiert auf morphologischen Kriterien (KERR, 1971; KERR et al.,

1972; WYLLIE et al., 1980; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b; SLOOP et al., 1999), dennoch ist eine schnellere und weniger subjektive Auswertungsmethode anzustreben (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b).

5.4.1.1. Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)

Die erhöhte Eosinophilie der meisten apoptotischen Körperchen (AB) (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996) hat in der vorliegenden Arbeit die Erkennung der Apoptosen mit dem Standard-Lichtmikroskop erleichtert. In der Regel lag zumindest ein deutlich gefärbtes AB in unmittelbarer Nähe zu weniger intensiv eosinophilen AB. Ging man davon aus, dass bei in Gruppen liegenden AB der Zerfall eines Hepatozyten zugrunde lag, genügte es zur Ermittlung der Apoptose-Indizes (AI), dass diese AB-Gruppen bei geringerer Vergrößerung durch ein deutlich gefärbtes AB aufzufinden waren (BURSCH et al., 1985; CONSTAN et al., 1996; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b; STINCHCOMBE, 1996).

Dennoch wird andererseits die Erfassung der Apoptose-Indizes anhand von Standard-H&E-Schnitten von einigen Autoren als unzuverlässige Methode dargestellt, da die Identifizierung der Apoptosen vom Stadium der Apoptose abhängig ist (LEVIN, 1995; CONSTAN et al., 1996). Zudem sind AB ohne Chromatin nicht in jedem Fall eindeutig von autophagischen Vakuolen differenzierbar (BURSCH et al., 1985). Weiterhin bestünde eine subjektive Interpretationsmöglichkeit und die notwendigen Experten würden einen erheblichen Kostenfaktor bedeuten (DAVISON et al., 1995; WHEELDON et al., 1995; CONSTAN et al., 1996). Diejenigen apoptotischen Zellen, die als Frühstadien bezeichnet werden und durch das sichel- bzw. halbmondförmig an der Kernmembran kondensierte Chromatin gekennzeichnet sind, wiesen nur vereinzelt eine gesteigerte Farbintensität auf. Aber anhand der Kernmorphologie und einem hellen Kernzentrum hoben sie sich deutlich von unveränderten Hepatozyten ab. Wie erwartet konnten auch in der vorliegenden Arbeit die sehr frühen Phasen der Apoptose ohne morphologisches Korrelat sowie die Endstadien der Apoptose wie z.B. die Restkörper (im LM nicht sichtbare Endabbauprodukte der Apoptosen) in den mit Standard-H&E gefärbten Präparaten nicht identifiziert werden (BURSCH et al., 1990; DAVISON et al., 1995; WHEELDON et al., 1995; CONSTAN et al., 1996). Dies erklärt, wieso in den vorliegenden Präparaten nur die wenigsten der AB sehr viel kleiner als ein Leberzellkern waren. Allerdings dürfte aufgrund der einheitlichen zeitlichen Abfolge der einzelnen Apoptosestadien (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985; 1990; 1992) kein Einfluss auf die Anstiegsfaktoren zu beobachten sein.

Die Schnitte der Carnoy-fixierten Lebern wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der alkoholischen H&E-Färbung hergestellt. Hierbei lag eine gegenüber der Standard-H&E-Färbung deutlich herabgesetzte Farbintensität vor, die sowohl unveränderte als auch apoptotische Hepatozyten betraf. Zusätzlich ergaben sich undeutlichere Grenzen der Zellen sowie der anderen Strukturen in der Leber. Entgegen STINCHCOMBE (1996) konnten im Standard-Lichtmikroskop nur durch eine erheblich gesteigerte Sorgfalt bei der Auswertung der einen Tag fixierten Präparate AI erhalten werden, die denen der Standard-H&E-gefärbten Präparaten entsprachen.

In der Literatur wird beschrieben, dass etwa 30% (BURSCH et al., 1985) bzw. rund die Hälfte (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b) der AB Chromatinfragmente aufweisen. Dass in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den Standard-H&E, als auch bei den mit alkoholischer H&E gefärbten Präparaten mit wenigen Ausnahmen (siehe Tab. 12-14) in der Regel der Anteil der chromatinhaltigen AB über 60% liegt, widerspricht diesen Aussagen nicht direkt. Im Gegensatz zu den genannten Arbeitsgruppen wurde von uns nicht jedes einzelne AB einer Gruppe auf den Chromatingehalt überprüft, sondern AB-Gruppen mit auch nur einem einzigen AB mit Chromatinfragmenten als ein Ereignis zu den chromatinhaltigen AB gezählt. Hieraus ergab sich, dass ebenfalls in diesen AB-Gruppen vorliegende chromatinlose AB nicht direkt erfasst wurden und ein geringerer prozentualer Anteil von AB ohne Chromatinfragmente die Folge war.

5.4.1.2. Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale

Die Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung bot eine ideale Voraussetzung zur empfohlenen morphologischen Abgrenzung der nekrotischen Zellen von den AB und den apoptotischen Zellen (GRASL-KRAUPP et al., 1995; DONG et al., 1997; LABAT-MOLEUR et al., 1998; RAY und JENA, 2000).

Erhebliche Schwierigkeiten bei dieser morphologischen Differenzierung, wie sie von LEVIN (1995) beschrieben wurden, lagen in der Regel in unserer Studie nicht vor. In keinem der Fälle zeigten die nekrotischen Zellen in den Schnitten der CCl₄-Gruppe ein für die Apoptose so typisches homogenes Zytoplasma. Vielmehr waren bei den Nekrosen mehr oder weniger deutliche Vakuolen im Zytoplasma zu erkennen. Somit wies der Großteil der Nekrosen bei einer Zunahme des Volumens ein ungleichmäßig gefärbtes, verwaschenes Zytoplasma auf. Weiterhin waren im Gegensatz zur Apoptose Zellverbände betroffen, die sich auf den perivenösen Bereich des Leberazinus beschränkten und in diesem Areal zu einem Verlust der Sinusoidstruktur führte. Durch diese Kriterien wurde ebenso wie durch das Vorhandensein von einzelnen Entzündungszellen die Zuordnung zur Nekrose erleichtert (KERR et al., 1972;

WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1984; 1985; 1986; MAJNO und JORIS, 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996a, b). Dies gilt aber nicht in jedem Fall, da z.B. bei der embryonalen Entwicklung größere Apoptosegruppen mit Abräumreaktion beobachtet werden konnten (MAJNO und JORIS, 1995). Weiterhin kann auch in der Leber ein Verlust der Gewebearchitektur die Folge sein, wenn das Ausmaß der Apoptose geeignet ist, den Entfernungsprozess (Phagozytose) zu überfordern (FELDMANN, 1997). In unterschiedlicher Menge vorhandenes karyorrhektisches Chromatin konnte sowohl in den geschwollenen Zellen als auch in den kleineren Zellfragmenten, die gleichfalls durch ein verwaschenes Zytoplasma gekennzeichnet waren, aufgezeigt werden.

5.4.1.3. Erkennen anderer unerwünschter Signale

Ein in der Standard-H&E-Färbung nicht zu lösendes Problem besteht darin, dass nicht-hepatozelluläre Apoptosen (z.B. Blut- oder Stromazellen), insbesondere nach Phagozytose, aufgrund der identischen Morphologie apoptotischer Zellen nicht von hepatozellulären Apoptosen differenzierbar sind (FARBER, 1994; ALISON und SARRAF, 1995).

Zudem wurden nach der CPA-Applikation vor allem in den periportalen Hepatozyten intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen beobachtet, welche maximal ein Drittel der Größe eines Zellkernes einnahmen. Eine Abgrenzung von apoptotischen Körperchen erwies sich als unproblematisch, da diese Gebilde in keinem Fall Kernreste enthielten, kontinuierlich eine ovale Gestalt aufwiesen, in großer Zahl im Zytoplasma einer Zelle vorlagen und zudem in der Regel keine verstärkte Eosinophilie aufwiesen. Mittels der PAS-Färbung wurden sie als Glykogenansammlungen identifiziert. Ähnliche Einschlüsse (autophagische Vakuolen) konnten auch bei der Regression der durch Phenobarbital (PB)-induzierten Leberhypertrophie (BOLENDER und WEIBEL, 1973), der Glukagon-induzierten Autophagie in der Rattenleber (DETER, 1971) und während dem physiologischen Turnover der Zellbestandteile (PFEIFER, 1982) beobachtet werden. Vermutlich basieren sie auf derselben Grundlage wie sie nach dem Entzug von PB aufgetreten sind (BOLENDER und WEIBEL, 1973), da sie in keinem der Präparate von den Kontrolltieren oder den Tieren, denen einmalig CCl₄ verabreicht wurde, nachgewiesen werden konnten.

5.4.1.4. Einfluss des Fixierungsmittels

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss der Fixierungsmittel auf die Darstellung der apoptotischen Zellen und Körperchen bei der Standard-Hämatoxylin-

Eosin-Färbung überprüft. Es ist allgemein bekannt (BUCHER und WARTENBERG, 1991), dass durch Fixierung die Strukturen der lebenden Zellen verändert werden und ein Äquivalentbild produziert wird. So beruht wie bei den meisten Fixierungsmitteln auch das Wesen der Alkoholfixierung auf einer eiweißfällenden Wirkung. Weiterhin ist bei der Alkoholfixierung eine Schrumpfung durch den Wasserentzug der Veränderung der Proteinstruktur zu beachten. Dagegen wird bei der Formaldehyd-Fixierung eine Eiweißvernetzung erreicht, die zu einem besseren Strukturerhalt führt. Die geometrischen Mittelwerte (MW) der AI bei den Lebern, die nach einem Tag Formaldehyd-Fixierung anschließend in Alkohol aufbewahrt wurden lagen bei den Dosisgruppen zu Beginn des Versuchs um 7%-16% über den AI nach reiner Formaldehyd-Fixierung. Hierbei zeigte sich kaum ein Unterschied der 95%igen Vertrauensbereiche der MW. Auch die Apoptose-Indizes der mit alkoholischer H&E gefärbten Carnoy-fixierten Proben wiesen nach einem Tag Fixierung annähernd gleiche Ergebnisse auf. Die geometrischen Mittelwerte lagen nach kurzer Fixierung zwischen den ermittelten Daten nach reiner Formaldehyd- und Formaldehyd/Alkohol-Fixierung. Ebenso wurden bei den Nekrose-Indizes bei alkoholischer und Standard-H&E-Färbung annähernd gleiche geometrische Mittelwerte (0,994%-1,173%) erhalten.

Somit kann bei kurzer Fixierung keinem der Fixierungsmittel ein Vorzug gegeben werden, wenngleich die Auswertung der Carnoy-fixierten Schnitte eine gesteigerte Sorgfalt mit erhöhtem Zeitaufwand gegenüber der Standard-H&E benötigt. Dieser Effekt beruhte aber auf der geringen Farbintensität bei Anwendung einer 0,4%igen alkoholischen H&E, als auf einem Einfluss durch das Fixierungsmittel. Jener Nachteil bei der Standard-Lichtmikroskopie wurde allerdings in Kauf genommen, da bei dieser Eosinkonzentrierung die beste fluoreszierende Eigenschaft der apoptotischen Körperchen in der Fluoreszenzmikroskopie erreicht wurde.

5.4.1.5. Einfluss der Fixierungszeit

Neben der Abklärung eines Fixierungsmittel-Einflusses nach kurzer Fixierung sollte auch ermittelt werden, ob sich bei längerer Fixierung (älteres Nassmaterial) Unterschiede in der Darstellung der Apoptosen und damit der Höhe der AI ergeben.

Bei längerer Aufbewahrung von Nassmaterial rein in Formaldehyd zeigten die geometrischen Mittelwerte (MW) der AI kaum Schwankungen. Dagegen ergab die Auswertung der Schnitte von den zunächst einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol aufbewahrten Lebern AI-Kurven, die bei den Versuchstiergruppen (Kontrolle, CPA-2-Tage, CPA-4-Tage) nicht die gleichen Tendenzen (Anstieg bzw. Abfall) aufwiesen. Es zeigte sich z.B. nach 92 Tagen Fixierung in der Tiergruppe, die zwei Tage nach der letzten CPA-Applikation getötet wurde (CPA-2-

Tage), ein erheblicher, unerklärbarer Anstieg des geometrischen Mittelwertes. In diesem Ausmaß wurde eine Zunahme der geometrischen MW nur bei den Standard-H&E gefärbten Präparaten beobachtet. Der geometrische Mittelwert lag hierbei nicht mehr in dem 95%igem Vertrauensbereich der geometrischen Mittelwerte zu Beginn des Versuchs. Insgesamt wurden bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben auch nach längerer Fixierung meist höhere Apoptose-Indizes (im Durchschnitt 5%-63%) als bei reiner Formaldehyd-Fixierung ermittelt. Als Ausnahme sei die CPA-4-Tage-Gruppe nach 92-tägiger Fixierung mit einem 7,5% niedrigeren AI genannt. Zudem bestanden im Vergleich zu der reinen Formaldehyd-Fixierung sehr viel größere 95%ige Vertrauensbereiche. Dies bedeutet, dass nach Formaldehyd/Alkohol-Fixierung stärker streuende Daten erhalten werden.

Im Gegensatz zur kurzen Fixierung (1 Tag) zeigten sich nach längerer Fixierung in Carnoy bei Färbung mit alkoholischer H&E Abweichungen von den Daten der Standard-H&E-Färbung. Mit der Fixierungszeit tendenziell abnehmend, wurden in den Carnoy-fixierten Präparaten durchschnittlich nur noch etwa halb so hohe Apoptose-Indizes erhalten, wie dies bei den in Formaldehyd bzw. Formaldehyd/Alkohol fixierten Lebern (Standard-H&E) der Fall war. Somit konnte auch durch eine gesteigerte Sorgfalt bei der Auswertung die schwächere Anfärbung der Strukturen nicht mehr kompensiert werden. Eine höhere Konzentrierung der alkoholischen Eosinlösung auf 1% erbrachte zwar den Vorteil besser erkennbarer Zellbestandteile und Zellgrenzen, allerdings wurde dann in der Fluoreszenzmikroskopie ein weniger gutes Ergebnis erhalten (Tab. 10 und 11). Der Einsatz einer 0,4%igen alkoholischen Eosinlösung für die Standard-Lichtmikroskopie kann somit aufgrund der schwachen Anfärbung nicht bei der Durchführung von Routinestudien und im Besonderen nicht bei länger fixiertem Material empfohlen werden.

Die Ermittlung der Nekrose-Indizes (NI) ergaben zum Teil bei den verschiedenen fixierten Präparaten leicht abweichende Ergebnisse. Die Kurven der NI wichen bei allen Fixierungsarten aber nur geringfügig voneinander ab, wenngleich wie bei den AI auch hier bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben meist etwas höhere Nekrose-Indizes festgestellt wurden als bei reiner Formaldehyd-Fixierung. Im Gegensatz zu den AI wurde bei den Carnoy-fixierten Präparaten (alkoholische H&E) kein bzw. nur ein geringer Abfall der NI bei längerer Fixierung festgestellt. Dies liegt vermutlich daran, dass die nekrotischen Zellen in Gruppen bzw. im Ring um die abführenden Venen vorliegen, die apoptotischen Körperchen aber in der Regel verstreut bzw. in sehr kleinen Gruppen auch in den anderen Leberazinuszonen auftreten. Das Auffinden der AB wird somit erschwert, was durch die schwächere Anfärbung beim Einsatz der alkoholischen Eosinlösung zusätzlich verstärkt wird.

5.4.2. Eosinfloureszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

Nach STINCHCOMBE (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996) war im Gegensatz zur standard-lichtmikroskopischen Auswertung die stärkere Eosinanfärbung bei der Auffindung der AB nicht nur dienlich, sondern ermöglichte erst die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop.

5.4.2.1. Einfluss des Fixierungsmittels und der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung)

Das Ausmaß der Fluoreszenz der AB ist unter anderen vom Fixierungsmittel, von der Schnittdicke (2-5 µm gilt als optimal) und von der Farbintensität abhängig (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996).

Es wird beschrieben, dass für die Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop in Carnoy fixierte Leberproben am Besten geeignet sind (STINCHCOMBE, 1996). Hingegen wurden bei Formaldehyd-fixierten Präparaten gelegentlich intensiv fluoreszierende Erythrozyten, fluoreszierende extrazelluläre Partikel sowie ein die Auswertung erschwerender autofluoreszierender Hintergrund beobachtet (KONG und RINGER, 1995, STINCHCOMBE, 1996).

Bei den mit der Standard-H&E-gefärbten Präparaten (4%ige wässrige H&E-Färbung) der vorliegenden Arbeit wurde sowohl nach reiner Formaldehyd- als auch nach Formaldehyd/Alkohol-Fixierung eine ausgeprägte Fluoreszenz des Zytoplasmas der unveränderten Hepatozyten sowie der elastischen Fasern beobachtet (GOLDSTEIN, 1969; STINCHCOMBE, 1996). Dies traf auch für die stichprobenweise überprüften, in Carnoy fixierten und mit der Standard-H&E gefärbten Proben aus Archivmaterial der BASF zu. Deshalb wurde unabhängig vom Fixierungsmittel bei der Standard-H&E-Färbung ein zu geringer Fluoreszenz-Kontrast erreicht.

In der Fluoreszenzmikroskopie sollen die besten Ergebnisse bei nicht zu starken Hämatoxylin- und alkoholischen Eosinfärbungen erzielt werden und dies soll auch auf die Standard-Lichtmikroskopie (LM) übertragbar sein (STINCHCOMBE, 1996). Dies kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Trotz Einhaltung der Färbanleitung von STINCHCOMBE (1996) lagen bei einer für die Fluoreszenzmikroskopie optimal eingestellten alkoholischen Eosinkonzentration (0,4%) im LM Schwierigkeiten in der Erkennung der AB vor. Nur durch eine gesteigerte Sorgfalt bei der Auswertung dieser Präparate konnten bei kurzer Fixierung AI ermittelt werden, die denen der Standard-H&E-Färbung entsprachen. In Übereinstimmung mit STINCHCOMBE (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996) nahm bei zunehmender Konzentrierung des Eosins die standard-lichtmikroskopische Identifi-

zierbarkeit der Apoptosen zwar zu, allerdings betraf die stärkere Eosinfärbung auch das Zytoplasma normaler Hepatozyten und bewirkte somit eine Reduktion der Fluoreszenz-Kontraste (siehe Kap. 4.2.3.). Ebenso kann bestätigt werden, dass der Einsatz einer geringeren Konzentration als 0,4% eine selbst für die Fluoreszenz zu geringe Farb- und damit Fluoreszenzintensität erbrachte.

5.4.2.2. Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen, apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)

Neben dem Einfluss des Fixierungsmittels, der Schnittdicke und der Färbeintensität wird auch eine Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Stadium der Apoptose sowie dem Chromatingehalt beschrieben (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996). So wiesen auch in der vorliegenden Arbeit die frühen Stadien der Apoptose, die durch sichelförmige Chromatinkondensation an der Kernmembran gekennzeichnet sind, keine Fluoreszenz auf. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Intensität der Fluoreszenz sich meist umgekehrt proportional zum Chromatingehalt verhielt (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996). Dies zeigte sich in einer intensiven Fluoreszenz der chromatinfreien AB und umgekehrt konnte bei apoptotischen Körperchen mit Chromatin nur eine schwächere bis völlig fehlende Fluoreszenz festgestellt werden. Dies beruht auf dem geringeren Gehalt an verdichtetem Zytoplasma (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996). Die Gegenüberstellung der mit der Fluoreszenz-Methode erfassten Daten mit den im Standard-Lichtmikroskop ermittelten AB - mit Auftrennung in chromatinhaltige und -lose AB - nach alkoholischer H&E-Färbung (Tab. 14, 15, 32-35, 57-60) veranschaulicht dies noch deutlicher. Der Anteil der chromatinhaltigen AB liegt bei der Fluoreszenz-Methode in jedem Fall bei allen Versuchstiergruppen deutlich unter denen mit der Standard-Lichtmikroskopie ermittelten Werten (Tab. 14, 15). Hierbei zeigt sich allerdings, dass die absolute Anzahl der chromatinlosen AB bei beiden Methoden meist und in den abweichenden Fällen annähernd gleich ist, dagegen aber deutlich weniger chromatinhaltige AB nachgewiesen wurden. Hieraus ergibt sich zwangsläufig ein höherer Anteil der chromatinlosen AB an der Gesamtmenge. Diese beiden Nachteile (ausbleibende Detektion der frühen Stadien sowie anteilig der chromatinhaltigen AB) führen zu einer Einschränkung der Anwendbarkeit dieser Methode, wenn alle Stadien detailliert erfasst werden sollen. Prinzipiell ist die frühe Phase (sichelförmige Chromatinkondensation) für die quantitative Analyse nur von untergeordneter Bedeutung, da sie *in vivo* innerhalb weniger Minuten abläuft (BURSCH et al., 1992). Desweiteren sind die Stadien der Apoptose durch eine einheitliche zeitliche Abfolge gekennzeichnet (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985; 1990; 1992), so dass

davon auszugehen ist, dass sich diese "falsch-negativen" Signale nicht auf die Anstiegsfaktoren der AI nach Substanzapplikation auswirken.

Ein Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie (FM) soll darin liegen, dass zusätzlich eine große Anzahl kleiner apoptotischer Körperchen, die im Standard-Lichtmikroskop (LM) kaum sichtbar sind, leicht erfasst werden. Hierdurch soll die Empfindlichkeit der quantitativen Analyse der Apoptose mit dem Fluoreszenzmikroskop um das 2-3-fache gegenüber der Standard-Lichtmikroskopie erhöht werden (STINCHCOMBE, 1996). STINCHCOMBE (1996) hat die Ergebnisse der quantitativen Auswertung mit beiden Methoden durch sich und einen unabhängigen 2. Untersucher tabellarisch dargestellt. Hierzu wurden von jedem Beobachter zwölf zufällig ausgewählte Felder (mit je 0,56 mm² Fläche) in Schnittpräparaten von drei Tieren ausgewertet. Die Daten aus dessen Studie wurden an Rattenlebermaterial gewonnen, welches frisch für ca. 18 Stunden in Carnoy-Fixans konserviert wurde. Die dort beschriebene alkoholische H&E-Färbung wurde in der vorliegenden Studie exakt übernommen. Die Werte von STINCHCOMBE (1996) (Tab. 24) wurden den Ergebnissen unserer Studie (Tab. 25) gegenübergestellt, wobei in Tabelle 25 die Werte des einen Tag fixierten Materials aus Tabelle 17 übertragen wurden:

Tab. 24: Gegenüberstellung der in der Standard-Licht- und/oder Fluoreszenzmikroskopie erkannten apoptotischen Körperchen (AB) aus der Studie von STINCHCOMBE (1996).

	Zahl der Hepatozyten mit apoptotischen Körperchen pro 20,16 mm ²			Nicht-apoptotische Fluoreszenz pro 20,16 mm ² FS
	LM+FM	LM	FM	
Beobachter Nr. 1	68 (52,3) ¹	4 (3,1) ¹	58 (44,6) ¹	n.b.
Beobachter Nr. 2	68 (51,9) ¹	3 (2,3) ¹	60 (45,8) ¹	n.b.
Summe	136 (52,1)¹	7 (2,7)¹	118 (45,2)¹	n.b.

¹ – prozentualer Anteil an Gesamtheit der AB; LM+FM - Apoptosen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Standard-Lichtmikroskop erkannt wurden; LM – nur mit dem Standard-Lichtmikroskop erkannte AB; FM – nur mit dem Fluoreszenzmikroskop erkannte AB; FS - fluoreszierende nicht-apoptotische bzw. fragliche Signale; n.b. - nicht bekannt

Tab. 25: Gegenüberstellung der in der Standard-Licht- und/oder Fluoreszenzmikroskopie erkannten apoptotischen Körperchen (AB) im Vergleich zu weiteren fluoreszierenden Signalen (in Prozent von allen fluoreszierenden Signalen) aus der vorliegenden Studie.

	Apoptotische Zellen und Körperchen pro 75 000 Zellen			Nicht- apoptotische Fluoreszenz pro 75 000 Zellen FS
	LM+FM	LM	FM	
Kontrolle	11 (78,6) ¹	3 (21,4) ¹	0 (0) ¹	23 (67,6) ²
CPA-2-Tage	200 (89,7) ¹	23 (10,3) ¹	0 (0) ¹	31 (13,4) ²
CPA-4-Tage	104 (80,0) ¹	26 (20,0) ¹	0 (0) ¹	9 (8,0) ²
Summe	315 (85,8)¹	52 (14,2)¹	0 (0)¹	63 (16,7)²

¹ – prozentualer Anteil an Gesamtheit der AB; ² – prozentualer Anteil der nicht-apoptotischen fluoreszierenden Signale an Gesamtheit der Fluoreszenzsignale; LM+FM - Apoptosen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Standard-Lichtmikroskop erkannt wurden; LM – nur mit dem Standard-Lichtmikroskop erkannte AB; FM – nur mit dem Fluoreszenzmikroskop erkannte AB; FS - fluoreszierende nicht-apoptotische bzw. fragliche Signale; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Somit wurde in der vorliegenden Studie im Vergleich zu STINCHCOMBE (1996) nicht nur ein weitaus größerer Anteil der AB mit dem LM und dem FM erkannt (LM+FM), sondern auch mehr AB ausschließlich mit dem LM ermittelt. Im Durchschnitt konnten die meisten fluoreszierenden Signale (83,3%) der Apoptose zugesprochen werden. Aber aufgrund der schwachen Färbung im LM war eine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenzsignale zur Apoptose nicht immer möglich. Somit musste ein großer Anteil (16,7%) als nicht-apoptotisch bzw. fraglich eingestuft werden. Von STINCHCOMBE (1996) wurden diese Fragmente den "nicht-klassischen" AB zugeordnet. Ob es sich in der vorliegenden Arbeit bei den, den FS zugeordneten Fluoreszenzsignalen um nicht-apoptotische Fluoreszenz handelt, konnte anhand der Morphologie weder vollständig ausgeschlossen noch bestätigt werden (siehe Kap. 5.4.2.4.). Eine ausschließliche fluoreszenzmikroskopische Detektion der AB ohne standard-lichtmikroskopische Kontrolle würde in unserem Material zu einem Verlust von durchschnittlich 14,2% der Apoptosen führen. Dies steht in einem deutlichen Kontrast zu den Ergebnissen von STINCHCOMBE (1996) mit einer theoretischen Einbuße von nur 2,7%.

5.4.2.3. Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale

In der Literatur wird von einer teilweisen Hypereosinophilie nekrotischer Herzmuskelfasern bei Hunden und Menschen in Standard-H&E-gefärbten Präparaten berichtet, welche in der Fluoreszenzmikroskopie eine leuchtend gelbe Fluoreszenz aufweisen (CARLE, 1981; SIEGEL und FISHBEIN, 1982). Morphologisch sind diese nekrotischen Fasern nicht mit apoptotischen Körperchen in der Leber zu verwechseln. Erstmals wurde mit der vorliegenden Arbeit auch die Fluoreszenz von nekrotischen Leberzellen überprüft. Neben den Apoptosen war ein nicht vernachlässigbarer Anteil (63,8% bis 65,4%) der eindeutig nekrotischen Zellen (CCl₄-Gruppe) im Fluoreszenzmikroskop positiv, wenngleich eine geringere Intensität des Signals als bei den AB zu beobachten war. Zudem konnte die unerwünschte Nekrose-Detektion durch eine morphologische Überprüfung in der Standard-Lichtmikroskopie korrigiert werden. Dies bedeutete allerdings einen beträchtlichen Mehraufwand.

Wie auch bei dem Nachweis der Apoptosen erkennbar war, liegt der Anteil der chromatinhaltigen Nekrosen bei der Fluoreszenz-Methode deutlich niedriger als bei der Standard-Lichtmikroskopie. Dies ist entsprechend den Daten der Apoptose hauptsächlich auf eine Maskierung der Fluoreszenz durch den Chromatingehalt der nekrotischen Zellen zurückzuführen, wenngleich dies bei der Auswertung – nach subjektiver Betrachtung – nicht der Fall zu sein schien. Allerdings zeigten auch die chromatinlosen nekrotischen Zellfragmente eine verminderte Fluoreszenz, wie es bei den Apoptosen nicht zu beobachten war. Dies ist auf die Schwellung der nekrotischen Zellen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980) und der damit auch im Standard-Lichtmikroskop schon erkennbaren geringeren Eosinophilie im Vergleich zu den Apoptosen zurückzuführen. Hieraus ergibt sich für die Fluoreszenz-Methode eine geringgradig höhere Sensitivität gegenüber der Standard-Lichtmikroskopie.

5.4.2.4. Erkennen anderer unerwünschter Signale

Wie bereits unter Kap. 5.4.2.2. erwähnt, konnten bei der 0,4%igen alkoholischen H&E-Färbung fluoreszierende Partikel in den Präparaten festgestellt werden, deren Zuordnung zu einer Apoptose anhand der Morphologie nicht möglich war. Diese Strukturen lagen zum Teil nicht innerhalb unveränderter Hepatozyten und wiesen nicht in jedem Fall eine vergleichbar intensive Fluoreszenz wie die AB auf. Chromatinfragmente lagen in keinem Fall vor. Dagegen ließen Strukturen wie zum Beispiel Erythrozyten und das Zytoplasma unveränderter Hepatozyten bei Einsatz einer 0,4%igen Eosinlösung fast keine Fluoreszenz erkennen. Allerdings konnte bei keiner der überprüften Eosinkonzentrationen eine deutliche Fluoreszenz der elastischen Fasern der Gefäßwände vermieden werden (GOLDSTEIN, 1969; STINCHCOMBE,

1996). Diese nahm aber nur bei Färbung mit der 1%igen Eosinlösung ein solches Ausmaß ein, dass die Fluoreszenz der in der Nachbarschaft liegenden AB teilweise überstrahlt wurde. Aufgrund der genannten Beobachtungen sowie der enormen Schwankung der Anzahl dieser fluoreszierenden Partikel, wobei sie insbesondere bei den Kontrolltieren sehr zahlreich auftraten, wurde von einer Zuordnung zu der Apoptose abgesehen. Die in Kapitel 4.1. genannten meist ovalen Zytoplasmaeinschlüsse (Glykogenansammlungen) wiesen keine verstärkte Fluoreszenz auf.

5.4.2.5. Einfluss der Fixierungszeit

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Fixierungszeit auf die Fluoreszenz der Apoptosen und der Nekrosen ermittelt.

Im Verlauf der Fixierungszeit nahm die Anzahl der apoptotischen Körperchen, die mit dem FM erkannt wurden, deutlich ab. Im Durchschnitt lagen die geometrischen Mittelwerte der AI nach sieben Tagen Fixierung nur noch etwa 0,7-fach und nach 28 und 92 Tagen nur noch 0,5-fach so hoch wie nach einem Tag Fixierung (siehe Tab. 61). Dementsprechend kam es zu einer Zunahme der ausschließlich mit dem Standard-Lichtmikroskop ermittelten Apoptosen von durchschnittlich 14,2% auf 40,3% (siehe Tab. 17). Weshalb es zu einem Verlust der Fluoreszenz kommt und ab welcher Fixierungszeit (zwischen einem und sieben Tage) die Abnahme der Fluoreszenz beginnt, ist unklar. Grundsätzlich verminderte sich bei längerer Fixierung der Vorteil einer schnelleren Auffindung der AB mittels der Fluoreszenzmikroskopie (STINCHCOMBE, 1996) erheblich.

Unerklärlicherweise wurde eine unterschiedliche Beeinflussung der fluoreszierenden Eigenschaften von Apoptose und Nekrose bei längerer Fixierung festgestellt, wobei es zu keiner Abnahme der Fluoreszenz nekrotischer Zellen kam. Ähnliche Beobachtungen sind in der Literatur nicht beschrieben, da weder andere Untersuchungen über die vergleichende Darstellung von Apoptose und Nekrose mittels der Fluoreszenz-Methode noch über die Beeinflussung durch die Fixierungszeit bei dieser Nachweismethode vorliegen. Gegebenenfalls spielt, wie auch bei der Besprechung der Standard-Lichtmikroskopie schon vermutet (Kap. 5.4.1.5.), die verstreute Lage der AB im Gegensatz zum zonalen Auftreten der Nekrose eine Rolle.

Zusammenfassend kann die Apoptose-Detektion mit dem FM nicht für den Einsatz bei Routinestudien empfohlen werden, da bei längerer Fixierungszeit wesentlich geringere Apoptose-Indizes erhalten wurden. Weiterhin zeigten mehr als die Hälfte der Nekrosen eine unerwünschte, wenngleich weniger intensive Fluoreszenz. Gegen Ende des Versuchs wies sogar ein größerer Prozentsatz der nekrotischen Zellen als der apoptotischen Zellen ein Fluoreszenzsignal auf.

5.4.3. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Bei der TUNEL-Methode erfolgte eine Markierung der während der Apoptose auftretenden DNS-Fragmente durch den Einbau modifizierter und dadurch nachweisbarer Nukleotide mit Hilfe der terminalen Transferase. Der in der vorliegenden Arbeit angewandte In Situ Cell Death Detection Kit von Boehringer erwies sich als einfach in der Anwendung und ergab ein hervorragendes Färbefeld mit starkem positiven Signal sowie minimalem Hintergrund (NEGOESCU et al., 1996).

5.4.3.1. Einfluss der Vorbehandlung der Präparate auf die Darstellung der Apoptosen

Es wird eine Beeinflussbarkeit der Färbeergebnisse bei der TUNEL-Methode durch Antigen-Retrieval beschrieben. In der vorliegenden Arbeit kann nicht bestätigt werden, dass ohne jegliche Vorbehandlung nur ein geringer Prozentsatz der Apoptosen (3-17% bzw. 8-51%) markiert wird (NEGOESCU et al., 1996; LABAT-MOLEUR et al., 1998), da lediglich eine geringere Intensität der Färbung nicht aber weniger markierte AB als nach Behandlung mit 20 µg/ml Protease beobachtet wurden. Dennoch wird nicht bestritten, dass intensivere Farben die Auswertung und die testweise durchgeführte automatisierte Auswertung erleichtern. Dem oben genannten widerspricht die Beobachtung von SHORT et al. (1997), die ein Antigen-Retrieval bei der Rattenleber erst nach einer Fixierungszeit von drei Tagen für nötig hielten. LABAT-MOLEUR et al. (1998) berichten zudem, dass erst mit Einsatz von 20 µg/ml Proteinase K über 15 Minuten bei Raumtemperatur 60% bis 70% der AB in Schilddrüsengewebe von Menschen, die an der Basedowschen Krankheit litten, erfasst werden. In der vorliegenden Studie lagen die AI der TUNEL-Methode generell über denen der Standard-H&E-Färbung, was eventuell auf der längeren Inkubationszeit von 25 Minuten oder der Verwendung von Protease von *Streptomyces griseus* statt Proteinase K beruht. Eine Konzentrationserhöhung auf 40 µg/ml Proteinase K soll dagegen eine nahezu komplette Färbung aller Kerne oder sogar eine "inverse Färbung", d.h. eine fehlende oder schwache Markierung der apoptotischen Zellen, umgeben von intensiver Färbung der normalen Kerne, bewirken (Zellkultur einer T-Zelllinie gewonnen aus einem Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie; NEGOESCU et al., 1996). Auch dies konnte hier durch eine Steigerung der Proteasekonzentration auf 40 µg/ml nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde ohne Verbesserung der Ergebnisse nur eine geringgradig gesteigerte unspezifische Färbung (Hintergrundfärbung) festgestellt.

Wenngleich nach der Färbung und Auswertung von Stichproben (jeweils 5 000 Zellen) zunächst der Einsatz höherer Proteasekonzentrationen bei dem vorliegenden 92 Tage fixierten Organmaterial nicht notwendig erschien, kann im Nachhinein nicht ausgeschlossen werden, dass höhere Proteasekonzentrationen oder eine längere Inkubationszeit zu besseren Ergebnissen führt. Denn erst bei der vollständigen Auswertung der Daten (jeweils 15 000 Zellen) fiel mit zunehmender Fixierungszeit bei den CPA-Gruppen mit erhöhtem AI eine Abnahme der markierten Apoptosen um 1%-25,8% im Vergleich zu der kürzeren Fixierungszeit (1 Tag) auf. Die Abnahme war bei den rein Formaldehyd-fixierten Proben deutlicher ausgeprägt als bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben. Allerdings wurde dies bei beiden Fixierungsmethoden von einem unerklärlichen Anstieg in jeweils einer CPA-Gruppe unterbrochen.

5.4.3.2. Darstellung der Apoptosen (apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen mit und ohne Chromatin)

Die von GORCZYCA et al. (1993b) und SHORT et al. (1997) beschriebene ausschließliche Färbung der Kernmembran einzelner Hepatozyten lag in unserer Studie nicht vor. Hierbei soll es sich um frühe lichtmikroskopisch nicht erkennbare Apoptosestadien handeln, die erst einzelne DNS-Strangbrüche aufweisen. Bei den frühesten auch lichtmikroskopisch sichtbaren Apoptosestadien wurde stets ein komplett gefärbter Kern nachgewiesen. Ob bei den unterschiedlichen Färberesultaten verschiedene Färbeprotokolle bzw. -Kits eine Rolle spielen, ist unklar. Die markierten apoptotischen Körperchen zeigten in der vorliegenden Arbeit meist eine vollständige Färbung, wobei bestätigt werden kann, dass zum Teil auch sehr kleine Fragmente erkennbar waren (CONSTAN et al., 1996). Dies verwundert insofern, als mit der TUNEL-Methode nur die DNS-Fragmente angefärbt werden (GOLDSWORTHY et al., 1996a, b) und prinzipiell eine partielle Markierung der AB erwartet wurde. Darüber hinaus fanden sich in der Nachbarschaft der AB einzelne ungefärbte, vermutlich chromatinlose AB. Einzeln liegende, chromatinlose auch mit der TUNEL-Methode nicht angefärbte AB wurden selten nachgewiesen, da die fehlende Eosinanfärbung der Präparate (ausschließliche Gegenfärbung mit Hämatoxylin) das Auffinden zusätzlich sehr erschwerte. Jene TUNEL-negativen AB gingen nicht in die Bestimmung des AI mittels der TUNEL-Methode ein.

Eine Gegenüberstellung ausschließlich der chromatinhaltigen AB aus der Auswertung der Standard-H&E-gefärbten Präparate (Tab. 12, 13 und 26-31) mit den Daten der TUNEL-Methode (Tab. 37-42) zeigten, dass mit letztgenannter Methode in jedem Fall mehr AB mit Chromatin nachweisbar waren. Bei der reinen Formaldehyd-

Fixierung lagen die TUNEL-Daten nach der kürzeren Fixierungszeit 2,0- bis 2,45-fach und bei der Formaldehyd/Alkohol-Fixierung mit einer größeren Streuung 1,64- bis 3,2-fach über den absoluten Werten der Standard-H&E-Methode. Wurden bei der Standard-H&E-Methode auch die chromatinlosen AB mit einbezogen ergaben sich 1,1- bis 1,7-fach (reine Formaldehyd-Fixierung) bzw. 1,2- bis 1,65-fach (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung) höhere Ergebnisse als mit der TUNEL-Methode. Die fehlende Korrelation der Ergebnisse aus beiden Methoden kann auf zwei sicher zusammen auftretenden Ursachen basieren. Zum einen wurden auch AB-Gruppen mit sehr kleinen Chromatinfragmenten aufgezeigt, die bei den Standard-H&E-gefärbten Präparaten gegebenenfalls nicht erkannt wurden und somit die AB-Gruppe in der Standard-Lichtmikroskopie den chromatinlosen AB zugerechnet wurde. Auf der anderen Seite wurden mit der TUNEL-Methode sicher auch einzelne AB markiert, die bei der Standard-H&E-Methode aufgrund der geringen Größe nicht erkannt wurden, vor allem wenn sie einzeln lagen.

5.4.3.3. Weitere positive TUNEL-Signale (Zytoplasmafärbung: unerwünschtes oder mit der Apoptose im Zusammenhang stehendes Signal?) in Hepatozyten

Neben den Kernmarkierungen und der Färbung der AB war in den Leberschnitten bei 0%-0,13% (reine Formaldehyd-Fixierung) bzw. 0%-0,2% (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung) aller morphologisch unveränderten Zellen (15 000 pro Leberschnitt) eine ausschließliche Zytoplasmafärbung (siehe Abb. 21) feststellbar.

Die Ursache der Zytoplasmafärbung wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

- 1) Auf der einen Seite wird dieses Phänomen präapoptotischen Zellen zugeschrieben, die kein morphologisches Korrelat aufweisen (GORCZYCA et al., 1993b; KONG und RINGER, 1995; NEGOESCU et al., 1996).
- 2) Andere Publikationen stellen die Hypothese auf, dass die Zytoplasmafärbung auf der Freisetzung von DNS-Fragmenten bei dem Abbau aufgenommener apoptotischer Körperchen beruht (WIJSMAN et al., 1993; WHEELDON et al., 1995; CONSTAN et al., 1996; SHORT et al., 1997).

Da in unseren Präparaten

- a) keine Zytoplasmafärbung bei den frühesten lichtmikroskopisch sichtbaren apoptotischen Zellen (sichel- bzw. halbmondförmig an der Kernmembran kondensiertes Chromatin) vorlag, wäre es doch erstaunlich, wenn im Verlauf der Apoptose zunächst das Zytoplasma der sogenannten präapoptotischen Zellen und im Anschluss hieran - bei den durch sichelförmige Chromatinkondensation definierten frühen sichtbaren Apoptosestadien - nur der Kern markiert werden würde. Auch

FEHSEL und ihre Kollegen (1994) widerlegen die Ansicht, dass es sich hierbei um präapoptotische Zellen handelt. Sie begründen dies damit, dass in ihrer Studie mit dem Elektronenmikroskop mehr apoptotische Zellen identifiziert werden konnten, als bei Markierung der DNS-Spaltungsfragmente.

Desweiteren bestand

- b) in der Regel keine zahlenmäßige Korrelation zwischen der Zytoplasmafärbung und der Apoptose. Pro 100 TUNEL-positive Apoptosen wurden bei reiner Formaldehyd-Fixierung 3,7 bis 31,58 und bei Formaldehyd/Alkohol-Fixierung 5,26 bis 26,23 morphologisch unveränderte Hepatozyten ebenfalls mit der TUNEL-Methode zytoplasmatisch gefärbt. Bei einer kontinuierlichen Zeitabfolge der einzelnen Apoptosestadien müßten in allen Gruppen (Versuchstiere, Fixierungsmittel und Fixierungszeit) eine Abhängigkeit dieser beiden Phänomene zu erkennen sein (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985; 1990; 1992). Dies wurde in einer Gegenüberstellung der scheinbar unveränderten TUNEL-positiven Zellen mit den Apoptosen überprüft (Abb. 11-16, Tab. 50-55). Die morphologisch unveränderten TUNEL-positiven Hepatozyten mit und ohne AB wurden hierbei gleich behandelt, da ein Vorliegen von AB in einer benachbarten Schnittebene nicht ausgeschlossen werden kann.
- c) Zudem wiesen die meisten AB enthaltenden Leberzellen unabhängig von der Größe der aufgenommenen Zellfragmente keine Zytoplasmafärbung auf.

Diese Feststellungen (a-c) widersprechen den Meinungen 1) und 2) und bekräftigen dagegen die Behauptung, dass

- 3) die Färbung des Zytoplasmas auf Artefakten beruht und als ein "falsch positives" Signal einzuordnen ist (FEHSEL et al., 1994). Hierbei wird über ein Auftreten von DNS-Fragmenten während Fixierung, Einbettung und Schneiden der Gewebeschnitte sowie der Vorbehandlung mit z.B. Proteinase K und HCl berichtet (GORCZYCA et al., 1993b; WIJSMAN et al., 1993; CONSTAN et al., 1996; SHORT et al., 1997). In die Kategorie "falsch positiv" sind auch die wenigen gefärbten Hepatozyten in der Leberlappenperipherie einzuordnen. Eine Autolysebedingte Zytoplasmafärbung (Einwirkung der freigesetzten lysosomalen Hydrolasen einschließlich der Nukleasen), die schon bei einer Verzögerung der Fixierung um drei Stunden eintreten soll (GRASL-KRAUPP et al., 1995; YANG et al., 1998) bzw. eine internukleosomale Nekrosebedingte DNS-Fragmentierung nach mehr als zweistündiger Fixierungsverzögerung (TATEYAMA et al., 1998), kann ausgeschlossen werden, da die Lebern der in diesem Versuch eingesetzten Ratten frisch in das Fixierungsmittel verbracht wurden.

Aufgrund der genannten Fakten wurden die morphologisch unveränderten Hepatozyten mit einer Zytoplasmafärbung bei der Erhebung der Apoptose-Indizes nicht berücksichtigt.

5.4.3.4. Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale

Nur von wenigen Arbeitsgruppen wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß die Markierung von nekrotischen Zellen mit der TUNEL-Methode erfolgt (WIJSMAN et al., 1993; GRASL-KRAUPP et al., 1995; SHI et al., 1998). Es liegen Beschreibungen über die Färbung von vakuolisierten, lytischen und nekrotischen Hepatozyten nach der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff (0,3 mg/kg KGW; männliche Wistar-Ratten) oder nach N-Nitrosomorpholin-Applikation (250 mg/kg KGW) vor (GRASL-KRAUPP et al., 1995; SHI et al., 1998). GORCZYCA et al. (1993b) berichten von einer etwa 10-fach höheren Sensitivität der TUNEL-Methode für Apoptosen, wobei die deutlichere Färbung der Apoptosen lediglich auf die größere Anzahl an Strangbrüchen gegenüber der Nekrose zurückzuführen ist (ANSARI et al., 1993; GORCZYCA et al., 1993b; NEGOESCU et al., 1996). Die während der Nekrose stattfindende internukleosomale DNS-Fragmentierung wird durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme induziert und führt zu einer zufälligen Verteilung der Spaltungsstellen (ANSARI et al., 1993; WIJSMAN et al., 1993; GRASL-KRAUPP et al., 1995; NEGOESCU et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch einmalige intraperitoneale Injektion von Tetrachlorkohlenstoff (0,1 mg/kg KGW) eine perivenöse Nekrose in der Leber induziert. Die in der Standard-H&E-Methode ermittelten nekrotischen Zellen (mit und ohne Chromatin) waren im Durchschnitt zu einem Drittel TUNEL-positiv, wobei in keinem Fall eine komplette und intensive Anfärbung, wie sie bei den apoptotischen Körperchen festgestellt werden konnte, vorlag. Vielmehr wurden zum einen Teil zwar "komplett gefärbte" Zellen beobachtet, diese wiesen aber neben einem schwach rosa gefärbtem Zytoplasma nur einzelne intensiv markierte Chromatinfragmente auf. Auf der anderen Seite lagen "teilweise gefärbte" nekrotische Zellen vor, bei denen ausschließlich die Chromatinfragmente intensiv durch FastRed sichtbar gemacht wurden. In fraglichen Fällen, in denen das unterschiedliche Färbeverhalten die Zuordnung zur Nekrose oder Apoptose nicht ermöglichte, wurden zusätzlich die morphologischen Kriterien herangezogen. Dies bedeutete allerdings einen zusätzlichen Zeitaufwand sowie vor allem in Folge der fehlenden Eosinfärbung einen Unsicherheitsfaktor.

Erfolgte eine Gegenüberstellung der mit der TUNEL-Methode ermittelten Daten ausschließlich mit den mittels der Standard-H&E-Methode erfassten chromatinhaltigen Nekrosen, lag der Anteil der TUNEL-positiven nekrotischen Zellen etwas höher als ein Drittel (siehe oben und Tab. 63-68, 73-78). Dass die Daten mit 34,5% bis 62,0% dennoch deutlich unter den Standard-H&E-Werten lagen, spricht auch hier für die höhere Sensitivität der TUNEL-Methode für Apoptosen (GORCZYCA et al., 1993b),

da hier die Anzahl der AB deutlich über den mit der Standard-H&E-Methode erhobenen Daten lag.

Somit liegt der Vorteil der TUNEL-Methode in der kräftigen Markierung der apoptotischen Zellen, der Nachteil aber in der zusätzlichen, wenn auch schwachen Färbung von nekrotischen Zellen. Dennoch wird das Auffinden der Apoptosen durch dieses Nachweissystem erheblich erleichtert (GOLD et al., 1993; WIJSMAN et al., 1993), aber der Einsatz einer automatisierten Anwendung durch die nicht erwünschte Markierung von Nekrosen eingeschränkt.

5.4.3.5. Erkennen anderer unerwünschter Signale

In der Literatur werden mit der Färbung von Zellen in der Mitose, Meiose und während der Genom-Reparatur (Topoisomerase II) weitere Ursachen einer "falsch positiven" Markierung mit der TUNEL-Methode diskutiert (ANSARI et al., 1993; NAKAMURA et al., 1995; WRONE-SMITH et al., 1997). In unserer Studie wurden demgegenüber keine TUNEL-positiven Zellen mit Mitosefiguren gefunden.

Es lag allerdings eine zusätzliche Markierung von anderen Zellen als Hepatozyten vor. Diese konnten zwar anhand von Morphologie und Lage als unveränderte Kupfer-Zellen bzw. ein kleiner Teil als Blutzellen identifiziert werden, aber auf welcher Grundlage diese Markierung basiert, konnte nicht geklärt werden. Eine apoptotische Morphologie wiesen sie aber in keinem Fall auf. Hieraus und aus der Tatsache, dass alle AB eine nahezu identische Morphologie aufweisen und somit hinsichtlich ihres Ursprungs nicht mehr differenzierbar waren, stellt sich die Frage, ob nicht auch ein Teil der als AB registrierten, phagozytierten Körperchen in den Hepatozyten zugrunde gegangene Blutzellen darstellen (FARBER, 1994; ALISON und SARRAF, 1995). Zusätzlich fließen auch die in den Sinusoiden liegenden Zellen durch ihre intensive Markierung bei automatisierter Auswertung ohne manuelle Kontrolle in die Apoptose-Indizes ein (siehe Kap. 4.2.1.). Mit 0-36 derartiger markierter Zellen pro 15 000 Hepatozyten (siehe Abb. 11-16 und Tab. 50-55) würde eine erhebliche Überbewertung der Apoptose-Indizes in allen Versuchstiergruppen - insbesondere aber in den Kontrollgruppen - erfolgen. Zeigen Prüfsubstanzen zusätzlich eine Wirkung auf die Anzahl der TUNEL-positiven nicht-hepatozellulären Signale, würden nicht nur die absoluten, sondern auch die relativen Werte verändert werden und eventuell ein anderer biologischer Effekt gemessen werden.

5.4.3.6. Einfluss des Fixierungsmittels

Im Rahmen dieser Studie sollte unter anderem überprüft werden, ob Fixierungsmittel-bedingte Unterschiede in dem Färbeverhalten beim Einsatz der TUNEL-Methode bestehen. Es wird angegeben, dass Formaldehyde mit den NH_2 -Gruppen der Amino- und Nukleinsäuren unter Bildung von Methylenbrücken bei gleichzeitiger Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen reagieren. Durch diese Verbindung zwischen den Proteinen und der DNS (Crosslinking) wird ein Verlust der DNS-Fragmente vermieden (GORCZYCA et al., 1993b; DAVISON et al., 1995; DOUGLAS et al., 1995). Es wird andererseits diskutiert, dass nach Alkoholfixierung durch fehlendes Crosslinking ein Verlust von Chromatinbruchstücken erfolgt, was im Anschluss zu verminderten Apoptose-Indizes führt (GORCZYCA et al., 1993b; NAKAMURA et al., 1995).

Da in der vorliegenden Studie die entsprechenden Leberproben erst nach eintägiger Formaldehyd-Fixierung in Alkohol überführt wurden, ist ein direkter Vergleich mit den Daten aus der Literatur nicht möglich. Bei den Lebern in den Dosisgruppen (CPA) wurden sogar höhere Apoptose-Indizes (geometrische Mittelwerte) erzielt (um 8%-32% höhere Werte) als bei den rein in Formaldehyd fixierten Organen (1 Tag Werte). Es scheint, dass die anfängliche Fixierung in Formaldehyd einem Chromatinbruchstückverlust entgegenwirken konnte. Ebenso wurde keine vermehrte Färbung nicht-apoptotischer Zellen beobachtet, wie es bei reiner Alkoholfixierung beschrieben wird (DOUGLAS et al., 1995).

5.4.3.7. Einfluss der Fixierungszeit

Neben den bereits genannten möglichen Einflussfaktoren wurde ergänzend überprüft, inwieweit die TUNEL-Methode auch an länger fixiertem Material angewandt werden kann und ob sich bei längerer Fixierung unterschiedliche Effekte bei der reinen Formaldehyd- oder der Formaldehyd/Alkohol-Fixierung ergeben.

Es wird beschrieben, dass der Prozess des Crosslinkings (siehe Kap. 5.4.3.6.) umso umfangreicher ist, je länger das Gewebe im Fixierungsmittel verbleibt (DAVISON et al., 1995). Hierbei soll eine reduzierte Markierung der Apoptosen mit der TUNEL-Methode die Folge sein und selbst eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration bis auf 200 $\mu\text{g/ml}$ keine bessere Markierung der AB bewirken. Vielmehr wird von einer vermehrten Färbung nicht-apoptotischer Zellen sowie von einer Ablösung der Schnitte von den Objektträgern berichtet (DAVISON et al., 1995).

Mit dem Crosslinking könnten die mit der Fixierungszeit tendenziell abnehmenden Apoptose-Indizes in den Lebern nach der reinen Formaldehyd-Fixierung bei Einsatz der TUNEL-Methode erklärt werden. In den Dosisgruppen (CPA-2- bzw. 4-Tage) wurden nach 92 Tagen Fixierung geometrische Mittelwerte der AI ermittelt, die nur

noch 0,8-fach bzw. 0,93-fach so hoch waren wie nach einem Tag Fixierung. In der Kontrollgruppe zeigte sich die Abnahme der TUNEL-positiven Apoptosen sogar noch deutlicher (0,38-fach).

Im Gegensatz hierzu nahm der Nachweis der TUNEL-positiven nekrotischen Zellen bei reiner Formaldehyd-Fixierung mit der Fixierungszeit kontinuierlich zu. Dies widerspricht der bei der Apoptose genannten Theorie des Crosslinkings mit nachfolgender reduzierter Markierung der DNS-Fragmente (DAVISON et al., 1995). Dagegen lagen bei den einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol verbrachten Proben über den Fixierungszeitraum nahezu konstante Ergebnisse vor. Eine Gegenüberstellung der TUNEL-Daten ausschließlich mit den in der Standard-H&E-Methode ermittelten chromatinhaltigen Nekrosen wies sogar eine kontinuierliche Abnahme der TUNEL-positiven nekrotischen Zellen auf. Auch dieses gegenläufige Verhalten apoptotischer und nekrotischer Zellen im Verlauf der Fixierung konnte nicht geklärt werden. Ähnliche Beobachtungen sind in den Publikationen mit gleichzeitigem Nachweis von Apoptose und Nekrose nicht beschrieben.

Bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Organen wurde keine Gesetzmäßigkeit im Verhalten der geometrischen Mittelwerte in Abhängigkeit von der Fixierungszeit festgestellt (Abb. 17 und Tab. 56). Scheinbar genügte auch hier die vorherige Kurzzeit-Formaldehyd-Fixierung zur Blockierung eines Chromatinbruchstückverlustes, wie er für die reine Alkoholfixierung beschrieben wird (GORCZYCA et al., 1993b; NAKAMURA et al., 1995), und die Überführung in Alkohol verhinderte ein zu starkes Crosslinking wie bei reiner Formaldehyd-Fixierung (DAVISON et al., 1995). Dennoch lagen nach dieser Formaldehyd/Alkohol-Fixierung breitere 95%ige Vertrauensbereiche der geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes vor, woraus sich weniger zuverlässige Daten ergaben.

Bei beiden Fixierungsarten wurden alle TUNEL-positiven Apoptosen, also auch die schwach markierten, berücksichtigt. Hierbei zeigte sich, dass bei beiden Fixierungsarten ein deutlicher Anstieg der schwach, sehr schwach und nicht gefärbten (TUNEL-negativen) Apoptosen bei längerer Fixierung auftrat (Abb. 5-10; Tab. 37-42, 44-49). Der Anteil dieser schwach bis gar nicht gefärbten Apoptosen betrug nach einem Tag Fixierung über alle Gruppen etwa 16% (reine Formaldehyd-Fixierung) bzw. 15% (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung). Nach 28 Tagen Fixierung erreichten diese Werte etwa 24% (reine Formaldehyd-Fixierung) bzw. 12% (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung), um in den folgenden zwei Monaten auf das fast drei- (43,6%) bzw. zweifache (37%) der Ausgangswerte anzusteigen. Die TUNEL-negativen Apoptosen (Tab. 44-49) nahmen in Ausnahmefällen maximal ein Sechstel der Gesamtmenge (TUNEL-positive und -negative Apoptosen) ein, womit der Anteil der TUNEL-negativen Apoptosen überraschend über dem der sehr schwach gefärbten Signale

(0%-5,26% der TUNEL-positiven Apoptosen) lag (Tab. 37-42). Der Einfluss der Fixierungszeit auf die Intensität der TUNEL-Färbung (Anteil schwach, sehr schwach und nicht gefärbter Apoptosen) war nicht so groß, dass er bei dem Großteil der Einzeltiere der Kontrollgruppe deutlich zu erkennen war. Dieses Ergebnis führt bei einer Betrachtung über alle Gruppen zu niedrigeren Anteilen der schwächer und nicht gefärbten (TUNEL-negativen) Apoptosen. Aber selbst bei dreimonatiger Aufbewahrung im Fixierungsmittel nahm auch bei den CPA-Gruppen der negative Einfluss der Fixierungszeit nicht ein derartig großes Ausmaß ein, wie er von DAVISON et al. (1995) beschrieben wurde. Diese Arbeitsgruppe konnte nach einer 50%igen Reduktion der TUNEL-positiven AB in drei bis vier Wochen fixierten Geweben bereits nach zwölf Wochen Fixierung fast keine markierten Apoptosen mehr auffinden.

Insgesamt wurde jedoch durch die Abnahme der Färbeintensität bei längerer Fixierung die Erkennung der Apoptosen erschwert und dies verursachte einen erheblichen zeitlichen Mehraufwand bei der Auswertung. Zudem konnte das probeweise eingesetzte rechnergestützte Bildanalysesystem diese schwachen Apoptosen nicht erfassen (siehe Kap. 4.2.1.), so dass niedrigere Apoptose-Indizes die Folge waren.

5.5. Vergleich der Nachweismethoden der Apoptose

5.5.1. Darstellung der Apoptosen

Es zeigte sich, dass die apoptotischen Zellen, die im Standard-Licht- und Fluoreszenzmikroskop nur durch sichel- bzw. halbmondförmig an der Kernmembran kondensierte Chromatin gekennzeichnet waren, sich bei der TUNEL-Methode ebenfalls durch eine Anfärbung hervorhoben. Hingegen wurden mit der TUNEL-Methode keine chromatinlosen AB markiert, allerdings mit der Einschränkung, dass nicht alle lichtmikroskopisch als chromatinlos identifizierten AB tatsächlich kein Chromatin enthalten (GOLDSWORTHY et al., 1996b). Hingegen wiesen chromatinhaltige AB mit zunehmendem Chromatingehalt eine verminderte Fluoreszenz auf. Bei der Standard-H&E-Färbung traten keine Unterschiede in der Erkennung dieser AB-Typen auf, allerdings wurden AB mit einer geringeren Größe als der Zellkerne nicht so leicht erkannt, wie bei den anderen beiden Methoden.

Wurden nun die ermittelten AI miteinander verglichen zeigte sich Folgendes:

Mit der Fluoreszenz-Methode wurden - wie auch bei der Standard-H&E-Methode - im Vergleich zu der TUNEL-Methode zu Beginn der Fixierungszeit geringere geometrische Mittelwerte der AI erhalten. Dieser Unterschied wurde durch den erheblichen Abfall der AI bei längerer Carnoy-Fixierung noch deutlicher und zeigte sich dann auch bei der Gegenüberstellung der mit der Standard-Lichtmikroskopie ermittelten Daten. Mit Hilfe der Fluoreszenz wurden mit der Fixierungszeit abnehmend maximal

etwas über die Hälfte (30%-69% nach 1 Tag bis 13%-48% nach 92 Tagen Fixierung) der mit der TUNEL-Methode erfassten apoptotischen Körperchen erkannt. Eine Erklärung für die Abnahme der Fluoreszenz bei anhaltender Fixierung konnte nicht gefunden werden, zumal sich im Standard-Lichtmikroskop keine verminderte Farbintensität abzeichnete. Allerdings zeigten die Anstiegsfaktoren (AI der Dosisgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe; Tab. 62) und deren Quotienten (Tab. 20) in der Fluoreszenzmikroskopie eine geringere Streuung, als dies bei der TUNEL-Methode der Fall war. Da die Reduktion der Fluoreszenz bereits nach sieben Tagen zu beobachten war, empfiehlt sich der Einsatz dieser Methode zur Bestimmung der AI nicht an Archivmaterial. Dennoch erleichterte die Fluoreszenz das Auffinden der apoptotischen Körperchen zumindest nach kurzer Fixierung erheblich (STINCHCOMBE et al., 1995; STINCHCOMBE, 1996).

Bei den mit dem Standard-Lichtmikroskop ausgewerteten Carnoy-fixierten Präparaten (alkoholische H&E-Färbung) wurden zu Beginn des Versuchs Daten erhalten, die etwa denen der Standard-H&E-Präparate entsprachen. Aber bei längerer Fixierung konnte auch ein gesteigerter zeitlicher Aufwand bei der Auswertung den negativen Einfluss der schwächeren Anfärbung nicht mehr vollständig ausgleichen. Somit empfiehlt sich auch die standard-lichtmikroskopische Auswertung der mit der alkoholischen 0,4%igen H&E-Färbung angefertigten Präparate an Archivmaterial nicht. Dieser Aspekt muss hinsichtlich der notwendigen morphologischen Kontrolle der mit der Fluoreszenz-Methode aufgefundenen AB in Betracht gezogen werden.

WHEELDON et al. (1995) haben bei der parallelen Auswertung von Leberpräparaten mit der Standard-H&E-Färbung und der ISEL-Technik (eine der TUNEL-Methode ähnliche Technik mit dem Einsatz eines anderen Enzyms, der DNS-Polymerase I) eine Übereinstimmung der AI bei unbehandelten Tieren festgestellt. Dagegen war die Zunahme der AI bei den Dosisgruppen (Anstiegsfaktoren) bei der Standard-H&E-Färbung deutlich größer als die mit der ISEL-Technik ermittelten Anstiegsfaktoren (AF). Dies verwundert, da zumindest mit der TUNEL-Methode auch spätere Stadien der Apoptose, wie z.B. die Restkörper als Endabbauprodukte der AB, erkannt werden sollen (CONSTAN et al., 1996), die bei rein morphologischer Beurteilung kaum zu erkennen sind. Zudem wird davon ausgegangen, dass die einzelnen Apoptosestadien in einer zeitlichen Abfolge ineinander übergehen (WYLLIE et al., 1980; BURSCH et al., 1985; 1992), weshalb bei den verschiedenen Nachweissystemen keine unterschiedlichen AF die Folge sein sollten. Eine Erklärung für die voneinander abweichenden AF wurde bisher nicht gegeben. Eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse bei der TUNEL-Methode durch verschiedenartige Sub-stanzapplikation kann ausgeschlossen werden, da auch von dieser Arbeitsgruppe (WHEELDON et al., 1995) CPA zur Apoptoseinduktion eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu der Studie

von WHEELDON et al. (1995) lagen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Standard-H&E-Werten die TUNEL-Ergebnisse auch bei den Dosisgruppen nach einem Tag reiner Formaldehyd-Fixierung um 33%-53% höher, so dass annähernd gleiche AF ermittelt wurden.

Höhere AI als bei der Standard-H&E-Methode fanden sich bei der TUNEL-Methode auch nach längerer Fixierung, obwohl eine Abnahme der TUNEL-positiven, deutlich gefärbten Apoptosen feststellbar war. Dagegen blieb bei den Standard-H&E-Präparaten die Farbqualität prinzipiell gleich. Dies wurde deutlich, indem mit der TUNEL-Methode nach 92-tägiger Fixierungszeit in den CPA-Gruppen nur noch etwa 6%-12% (reine Formaldehyd-Fixierung) bzw. 7%-14% (Formaldehyd/Alkohol-Fixierung) höhere Apoptose-Indizes als mit der Standard-H&E-Methode festgestellt wurden. Die höhere Empfindlichkeit der TUNEL-Methode (gegenüber Standard-H&E-Methode) zeigte bei den Versuchstiergruppen allerdings nicht in jedem Fall das gleiche Ausmaß. Es wurden größere Schwankungen der AI und breitere 95%ige Vertrauensbereiche erhalten, die in diesem Umfang bei der Standard-H&E-Auswertung nicht beobachtet wurden. Wurden aus den Anstiegsfaktoren (AF) der beiden Dosisgruppen (CPA) Quotienten gebildet (AF-2-Tage/AF-4-Tage) zeigte sich auch hier nach der Standard-H&E-Färbung eine geringere Streuung (1,89-2,12) bei den rein Formaldehyd-fixierten Präparaten als bei der TUNEL-Methode (1,85-2,46) (siehe Tab. 20). Bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben traf dies im Wesentlichen auch zu. Allerdings wurden nach 92-tägiger Fixierung sowohl bei der TUNEL- als auch bei der Standard-H&E-Methode Quotienten mit Werten von >3 erhalten. Dies erklärt sich durch den gegenläufigen Kurvenverlauf der geometrischen Mittelwerte der AI bei den beiden Dosisgruppen (CPA-2- bzw. 4-Tage) (Abb. 4, 17). Somit nahmen in der vorliegenden Arbeit die Unterschiede bei den Anstiegsfaktoren nicht ein solches Ausmaß an, wie sie von WHEELDON et al. (1995) beschrieben wurden. Dennoch verwundert der gegenläufige Kurvenverlauf bei den beiden Dosisgruppen, insbesondere da die individuellen Schwankungen der Einzeltiere durch die Datentransformierung bedeutungslos wurden und bei den verschiedenen Fixierungszeiten das gleiche Tiermaterial zum Einsatz kam.

Da bei den Formaldehyd/Alkohol-fixierten Lebern generell breitere Schwankungen der AI erhalten wurden und keine Gesetzmäßigkeit als Abhängigkeit von der Fixierungszeit zu erkennen war, zeigten sich die Daten der Formaldehyd/Alkohol-fixierten Proben unzuverlässiger als nach reiner Formaldehyd-Fixierung. Daher sollte auch bei längerer Fixierungszeit die reine Formaldehyd-Fixierung sowohl bei der Standard-H&E-Färbung als auch bei der TUNEL-Methode bevorzugt werden.

Allerdings wurden bei der TUNEL-Methode auch die schwach markierten AB berücksichtigt und diese nahmen sowohl bei der Formaldehyd/Alkohol- als auch bei der

reinen Formaldehyd-Fixierung bei längerer Fixierungszeit zu. Dies bedeutet infolge der zusätzlich notwendigen morphologischen Kontrolle einen erheblichen zeitlichen Mehraufwand bei der Auswertung sowie einen Unsicherheitsfaktor. Ebenso kann nur eingeschränkt mit einem rechnergestützten Bildanalysesystem gearbeitet werden. Gegenüber der Standard-H&E-Färbung bestehen also neben dem Einfluss der Fixierungszeit auf die Färbeintensität folgende Nachteile der TUNEL-Methode:

- a) Die Daten zeigen eine größere Streuung,
- b) unerwünscht positive Markierung nicht-hepatozellulärer Zellen,
- c) ein Teil der nekrotischen Zellen wird unerwünscht markiert (siehe Kap. 5.5.2.),
- d) fragliche Markierung von morphologisch unveränderten Hepatozyten.

Ein positives TUNEL-Signal kann folglich nicht ohne gleichzeitige morphologische Kontrolle beurteilt werden.

5.5.2. Erkennen von Nekrosen als unerwünschte Signale

Mit der TUNEL-Methode wurden unerwünscht neben den Apoptosen zusätzlich etwa ein Drittel der nekrotischen Zellen markiert. Dass hierbei eine meist starke Anfärbung der Apoptosen und eine schwache bzw. nur anteilig intensive Färbung der Nekrosen erfolgte, erleichterte die morphologische Differenzierung. Bei der Fluoreszenz-Methode wiesen demgegenüber sogar 63,8%-65,4% der nekrotischen Zellen in den von uns ausgewerteten Leberpräparaten eine Eosinfluoreszenz auf (Tab. 22), wenngleich sich diese weniger intensiv als die der Apoptosen darstellte.

Die empfohlene Bestätigung der Differenzierung der Apoptosen von den Nekrosen anhand morphologischer Kriterien (GRASL-KRAUPP et al., 1995; DONG et al., 1997; LABAT-MOLEUR et al., 1998) war bei beiden Nachweissystemen zum Teil erheblich erschwert. Denn nicht nur bei der TUNEL-Methode (ausschließlich Hämatoxylin als Gegenfärbung), sondern auch bei der Eosinfluoreszenz (weniger farbin-tensive alkoholische H&E-Färbung) waren die einzelnen Zellbestandteile und auch die Zellgrenzen nur eingeschränkt zu erkennen. Allerdings konnten auch hier die unter Kap. 5.4.1.2. beschriebenen Kriterien teilweise zur Differenzierung herangezogen werden. Bei der Standard-H&E-Färbung auf der Basis einer wässrigen 4%igen Eosinlösung ergaben sich dagegen keine Probleme, da die morphologische Kontrolle durch das klare Färbepild erleichtert wurde. Damit ist die standardlichtmikroskopische Auswertung der Standard-H&E-gefärbten Präparate den anderen Nachweissystemen zur Erkennung der Apoptose und ihrer Abgrenzung von der Nekrose überlegen.

5.5.3. Erkennen anderer unerwünschter Signale

Prinzipiell wurden bei allen Methoden Strukturen erfasst, die weder als Apoptose noch als Nekrose eingestuft werden konnten.

Bei der Standard-H&E-Färbung waren die durch die CPA-Applikation hervorgerufenen intrazytoplasmatischen Glykogeneinschlüsse leicht von apoptotischen Körperchen ohne Chromatinfragmente zu differenzieren. Bei der TUNEL-Methode konnten die unerwünschten nicht-hepatozellulären positiven Signale (z.B. Kupffer-Zellen) meist anhand der Form und Lokalisation durch eine zusätzliche morphologische Kontrolle von der hepatozellulären Apoptose abgegrenzt werden. Anhand der Farbintensität und der Größe war dies alleine nicht möglich, weshalb dieser Aspekt bei einer rechnergestützten Auswertung mit dem Bildanalysegerät ein Problem darstellen dürfte. Die unerwünschte Fluoreszenz intra- und extrazellulärer Signale lag bei optimaler Einstellung der alkoholischen H&E meistens kaum über der des Zytoplasmas der unveränderten Hepatozyten (STINCHCOMBE, 1996). Mittels der Fluoreszenz wurden hier nur einige intrazytoplasmatische Körperchen nachgewiesen, bei denen eine Zugehörigkeit zur Apoptose nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Die morphologische Kontrolle erbrachte hierbei aber aufgrund der schwachen alkoholischen H&E-Färbung keine weiteren Erkenntnisse.

6. Zusammenfassung

1. Die Nachweismethoden H&E-Färbung (Standard H&E- und alkoholische H&E-Färbung), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL-Methode) und die Eosinflouoreszenz wurden zum Apoptose-nachweis an Rattenlebergewebe herangezogen. Hierfür wurde ein Apoptoseinduktionsmodell nach BURSCH et al. (1984; 1985; 1986) verwandt (Cyproteronacetat-Entzug nach mehrtägiger Applikation). Das Gewebe wurde zwischen 1 und 92 Tagen rein in Formaldehyd, einen Tag in Formaldehyd fixiert und anschließend für die angegebene Zeit in Alkohol überführt oder in Carnoy fixiert. Zur Spezifitätskontrolle wurde ermittelt, inwieweit nekrotische Zellen oder andere unerwünschte Strukturen gleichfalls erfasst wurden.

2. Standard H&E- und alkoholische H&E-Färbung:

Um die geringsten Schwankungen der Werte auch bei archiviertem Nassmaterial zu erhalten, ist die Auswertung von Studien im Standard-Lichtmikroskop an Standard-H&E-Schnitten nach einer reinen Fixierung in Formaldehyd zu empfehlen. Sowohl bei der Routinefixierung (1 Tag) als auch beim Einsatz an Archivmaterial wurden hierbei die geringsten Schwankungen der Apoptose-Indizes erhalten. Zytoplasmatische Einschlüsse und nekrotische Zellen waren in der Regel gut von der Apoptose abgrenzbar. Somit ist die Erhebung der AI durch die Kriterien der Morphologie weiterhin Standardmethode.

Bei den einen Tag Formaldehyd-fixierten und anschließend in Alkohol verbrachten Organen zeigte sich keine Gesetzmäßigkeit im Verhalten der geometrischen Mittelwerte in Abhängigkeit von der Fixierungszeit. Zudem ergaben sich größere 95%ige Vertrauensbereiche der geometrischen Mittelwerte der Apoptose-Indizes als bei reiner Formaldehyd-Fixierung. Daher erwiesen sich die Daten nach reiner Formaldehyd-Fixierung als zuverlässiger.

Die Carnoy-Fixierung in Kombination mit der 0,4%igen alkoholischen H&E-Färbung hat bei standard-lichtmikroskopischer Auswertung aufgrund der schwachen Anfärbung das Ziel einer schnellen und sicheren Auswertung nicht erreicht.

3. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

Im Vergleich zu der Standardmethode (Standard-H&E-Färbung) wurden mit der TUNEL-Methode höhere Apoptose-Indizes erhalten. Hierbei musste allerdings eine breitere Streuung der Apoptose-Indizes im Vergleich zu der Standard-H&E-Färbung in Kauf genommen werden. Zudem reduzierte sich die Mehrmarkierung bei längerer Fixierung und es zeigte sich weiterhin eine Reduktion der Färbeintensität, so dass

beim Einsatz an Archivmaterial ein größerer Unsicherheitsfaktor besteht als bei der Standard-H&E-Färbung. Durch die mit der Zeit zunehmend geringere Färbeintensität wurde der angenommene Vorteil einer schnelleren Auswertung eingeschränkt. Weiterhin traten sehr starke nicht-hepatozelluläre TUNEL-positive Signale auf und nekrotische Zellen wurden zu 22%-40% ebenfalls markiert. Die zusätzlich notwendige morphologische Kontrolle ließ somit keine unkritische Auswertung der positiven Signale zu und schränkt den Einsatz eines rechnergestützten Bildanalysegerätes erheblich ein.

Wurden die Lebergewebeproben nach einem Tag in Formaldehyd-Fixierung anschließend in Alkohol aufbewahrt, wurden die höchsten AI erhalten, allerdings – wie auch bei der Standard-H&E-Färbung - mit dem Nachteil breiterer 95%iger Vertrauensbereiche der Mittelwerte als bei reiner Formaldehyd-Fixierung und somit unzuverlässigerer Daten.

4. Eosinfluoreszenz

Bei der Fluoreszenz-Methode wiesen die Quotienten der Anstiegsfaktoren beider Dosisgruppen (der Anstiegsfaktor entspricht dem Anstieg des AI von der Kontrolle auf den AI der jeweiligen Dosisgruppe) gegenüber der TUNEL-Methode weniger breite Streuungen auf und die AI entsprachen nach eintägiger Fixierung in etwa den Standard-H&E-Daten. Somit schien die Fluoreszenz-Methode zur Beschreibung biologisch relevanter Effekte geeignet zu sein. Trotzdem kann der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie an Archivmaterial nicht befürwortet werden, da bereits nach siebentägiger Fixierung die Apoptose-Indizes erheblich reduziert waren und nach vierwöchiger Fixierung die AI nur noch auf halber Höhe der Ausgangswerte lagen. Dennoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass das Auffinden der AB nach einem Tag Fixierung anhand der Fluoreszenzmikroskopie erheblich erleichtert wird (STINCHCOMBE, 1996). Allerdings wiesen mehr als die Hälfte der nekrotischen Zellen eine Fluoreszenz auf, damit wurden im Durchschnitt zweimal mehr unerwünschte Nekrosen erfasst, als mit der TUNEL-Methode. Ebenso wurden fluoreszierende Strukturen (FS) ermittelt, die nicht der Apoptose zugeordnet werden konnten. Da eine morphologische Kontrolle aufgrund der schwachen Färbung (alkoholische H&E-Färbung) kaum möglich war und bei längerer Fixierung ein zunehmendes Ausbleiben einer Fluoreszenz der AB zustande kam, wird insbesondere der Einsatz der Fluoreszenz-Methode an Material, das länger als sieben Tage fixiert wurde, nicht empfohlen.

7. Summary

1. Detection of apoptotic cells and bodies in rat liver was determined by hematoxylin and eosin (H&E)-staining (standard and alcoholic H&E), terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL method), and eosin fluorescence. We used the apoptotic induction model of BURSCH et al. (1984; 1985; 1986), that is based on application and removal of cyproterone acetate, in order to obtain high apoptotic indices. The tissue samples were fixed over various time periods between 1 and 92 days. Three fixation methods were used: formaldehyde only, one day formaldehyde fixation followed by a 70% ethanol fixation, or fixation in carnoy solution. Necrotic cells or other positive structures which could be mistaken for apoptotic hepatocytes were counted as a control for specificity.

2. Standard H&E- and alcoholic H&E-staining

To avoid individual changes in the results, the use of standard light microscopy in combination with standard H&E-staining after formaldehyde fixation only is recommended. Both, routine (one day) and long term (several weeks) fixation with 4% formaldehyde achieved the best apoptotic indices with the lowest variety. Cytoplasmatic inclusions and necrotic cells could usually be differentiated clearly from apoptotic cells. Consequently the morphological characteristics of apoptotic cells and bodies were used as the standard method for determination of apoptotic index (AI).

No association between the geometric mean value of AI and the time of fixation could be detected for the fixation method with formaldehyde followed by ethanol. However, the 95% confidence interval of mean values was larger compared to the data achieved after fixation in formaldehyde only. We conclude that the data obtained after pure formaldehyde fixation is more reliable.

Carnoy fixation followed by alcoholic H&E staining showed only very weak staining and was therefore not useful for rapid and specific determination of apoptotic rates by standard light microscopy.

3. Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)

Compared to AI obtained by H&E staining and standard light microscopy the AI measured with the TUNEL method were higher. We could also show that the AI results had bigger variations. Longer fixation times reduced the amount of TUNEL-positive apoptotic cells and bodies accompanied by reduced intensity of the staining. Therefore, use of TUNEL staining for material fixed over longer time periods seems to result in less reliable data. Due to the decreasing colour intensity after several weeks of fixation, a rapid evaluation of the samples was no longer possible. Also non-hepatocytes and 22%-40% of the necrotic cells were TUNEL positive and

showed intense staining. In conclusion, the TUNEL method in combination with an image processing and analysis system is only useful in combination with morphologic control of positive signals.

The highest AI were determined with fixation of the material in formaldehyde followed by ethanol. The 95% confidence interval, however, was broader than after formaldehyde fixation only, thus the data less reliable.

4. Eosin fluorescence

Using the eosin fluorescence technique for estimating apoptotic indices yielded AI quotients (AI treated animals divided by AI of untreated animals) with lower standard deviations compared to the AI quotients calculated from the data obtained via TUNEL staining. After one day of fixation the data obtained via the eosin fluorescence was similar to the data determined by using the H&E staining. However, our study showed that with the eosin fluorescence a reduction of AI is already happening after a fixation period of 7 days. After tissue fixation over four weeks, the AI was reduced to 50% of the values determined after one day fixation. Easy and fast recognition of apoptotic bodies with the fluorescence method after a short time fixation is still an advantage of this method (STINCHCOMBE, 1996). More than 50% of necrotic cells showed fluorescence, too, meaning that the average number of determined necrotic cells was twice as high as the number of TUNEL-positive necrotic cells. Additionally, we found fluorescing structures (FS) in the tissue that could not be related to an apoptotic event. A morphologic control with H&E is nearly impossible because of the very weak tissue staining due to the alcoholic H&E staining method. This and the observation of fading fluorescence of apoptotic bodies with prolonged fixation time, leads to the recommendation to use the fluorescence technique only in tissue fixed for less than 7 days.

8. Anhang

8.1. Abbildungen

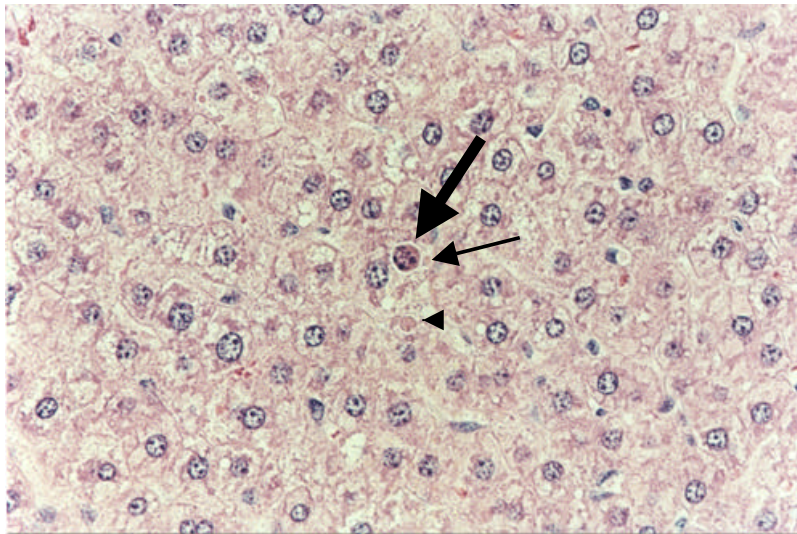


Abb. 20: Standard-H&E-Färbung, 1 Tag reine Formaldehyd-Fixierung, Leber, Ratte, CPA-2-Tage, Tiernummer 7, 400x
Deutlich eosinophiles AB mit Chromatinfragmenten (großer Pfeil), sehr kleines chromatinloses AB (kleiner Pfeil), chromatinloses AB (Pfeilspitze); alle drei mit "Halo" (ungefärbter Randsaum)

CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; AB – apoptotisches Körperchen

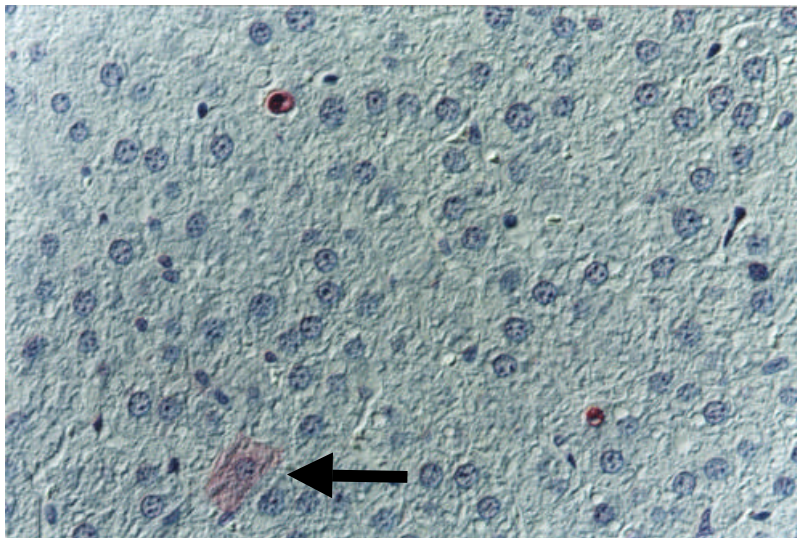


Abb. 21: TUNEL-Methode, 1 Tag reine Formaldehyd-Fixierung, Leber, Ratte, CPA-2-Tage, Tiernummer 6, 400x
Zwei deutliche TUNEL-positive AB mit sichtbarem Chromatin (Zytoplasma der AB auch TUNEL-positiv); morphologisch unveränderte Leberzelle mit schwacher Zytoplasmafärbung (Pfeil) ohne AB in Schnittebene

TUNEL – terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; AB – apoptotisches Körperchen

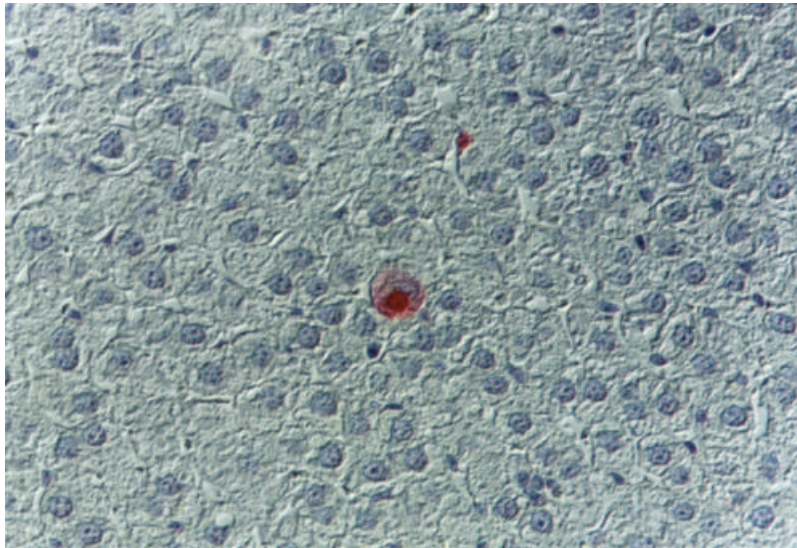


Abb. 22: TUNEL-Methode, 1 Tag reine Formaldehyd-Fixierung, Leber, Ratte, CPA-2-Tage, Tiernummer 7, 400x

Deutlich TUNEL-positives AB mit sichtbarem Chromatin im Zytoplasma einer morphologisch unveränderten Leberzelle, die ebenfalls eine schwache Zytoplasmafärbung aufweist; Zellkern der phagozytierenden Leberzelle durch AB deutlich bohnenförmig eingekerbt

TUNEL – terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; AB – apoptotisches Körperchen

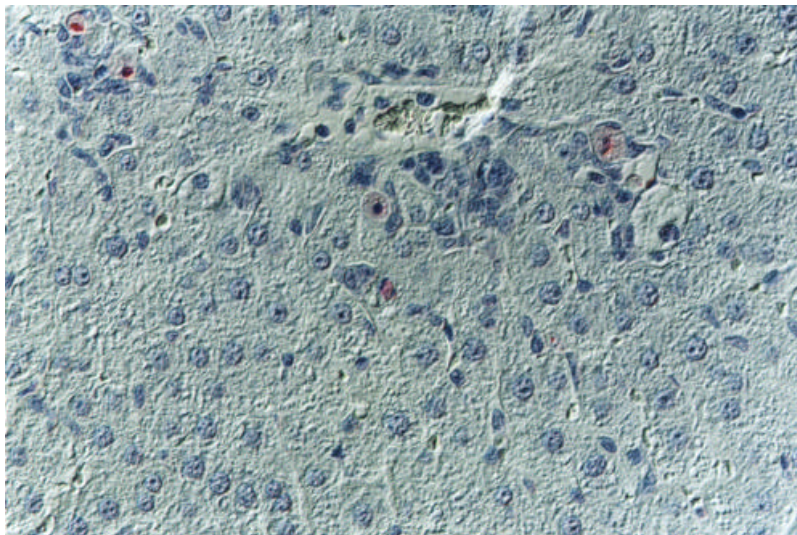


Abb. 23: TUNEL-Methode, 1 Tag reine Formaldehyd-Fixierung, Leber, Ratte, CCl₄-Gruppe, Tiernummer 18, 400x

Ausschließlich im Kernbereich granulär oder komplett (im Kernbereich granuläre und schwache diffuse Zytoplasmafärbung) TUNEL-positive nekrotische Zellen in Umgebung der abführenden Vene, mäßige entzündliche Infiltration

TUNEL – terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA – Cyproteronacetat; CPA-2-Tage – zwei Tage CPA-Entzug; AB – apoptotisches Körperchen

8.2. Tabellen zu den Ergebnissen aus dem Nachweis von Apoptosen mit der Standard-Lichtmikroskopie (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), der TUNEL- und der Eosinfluoreszenz-Methode

8.2.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

8.2.1.1. Einzeltierdaten - Apoptotische Zellen und Körperchen (mit und ohne Chromatin) sowie Apoptose-Indizes (in Prozent)

8.2.1.1.1. Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung

Tab. 26: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	2	1	0	3	0,013	0,020
	2	4	1	0	5	0,027	0,033
	3	0	2	0	2	0,000	0,013
	4	2	1	0	3	0,013	0,020
	5	2	1	0	3	0,013	0,020
	SUMME	10	6	0	16		
CPA-2-Tage	6	57	45	0	102	0,380	0,680
	7	25	19	0	44	0,167	0,293
	8	31	19	0	50	0,207	0,333
	9	9	5	0	14	0,060	0,093
	10	17	5	0	22	0,113	0,147
	SUMME	139	93	0	232		
CPA-4-Tage	11	14	5	0	19	0,093	0,127
	12	5	3	0	8	0,033	0,053
	13	36	36	1	73	0,247	0,487
	14	6	4	0	10	0,040	0,067
	15	13	13	0	26	0,087	0,173
	SUMME	74	61	1	136		

AB - Apoptotisches Körperchen; AC - Apoptotische Zelle; AI [%] - Apoptose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Tab. 27: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	0	2	0	2	0,000	0,013
	3	4	0	0	4	0,027	0,027
	4	1	0	0	1	0,007	0,007
	5	2	0	0	2	0,013	0,013
	SUMME	8	2	0	10		
CPA-2-Tage	6	64	39	2	105	0,440	0,700
	7	44	18	1	63	0,300	0,420
	8	25	12	0	37	0,167	0,247
	9	17	18	0	35	0,113	0,233
	10	16	13	1	30	0,113	0,200
	SUMME	166	100	4	270		
CPA-4-Tage	11	22	7	0	29	0,147	0,193
	12	11	2	0	13	0,073	0,087
	13	36	15	2	53	0,253	0,353
	14	2	7	0	9	0,013	0,060
	15	20	12	1	33	0,140	0,220
	SUMME	91	43	3	137		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 28: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	4	1	0	5	0,027	0,033
	3	2	1	0	3	0,013	0,020
	4	1	0	0	1	0,007	0,007
	5	0	1	0	1	0,000	0,007
	SUMME	8	3	0	11		
CPA-2-Tage	6	76	27	1	104	0,513	0,693
	7	35	11	0	46	0,233	0,307
	8	32	13	0	45	0,213	0,300
	9	12	8	0	20	0,080	0,133
	10	24	6	1	31	0,167	0,207
	SUMME	179	65	2	246		
CPA-4-Tage	11	18	10	0	28	0,120	0,187
	12	8	1	0	9	0,053	0,060
	13	59	17	3	79	0,413	0,527
	14	3	8	0	11	0,020	0,073
	15	16	6	0	22	0,107	0,147
	SUMME	104	42	3	149		

Legende: siehe Tabelle 27

8.2.1.1.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung

Tab. 29: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 2,5 Tage in Alkohol

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	3	1	0	4	0,020	0,027
	3	0	3	0	3	0,000	0,020
	4	2	2	0	4	0,013	0,027
	5	0	1	0	1	0,000	0,007
	SUMME	6	7	0	13		
CPA-2-Tage	6	74	45	1	120	0,500	0,800
	7	38	13	0	51	0,253	0,340
	8	21	15	0	36	0,140	0,240
	9	11	10	0	21	0,073	0,140
	10	13	8	0	21	0,087	0,140
	SUMME	157	91	1	249		
CPA-4-Tage	11	12	8	0	20	0,080	0,133
	12	9	1	0	10	0,060	0,067
	13	40	18	2	60	0,280	0,400
	14	14	2	0	16	0,093	0,107
	15	25	7	0	32	0,167	0,213
	SUMME	100	36	2	138		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 30: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	2	1	0	3	0,013	0,020
	3	3	0	0	3	0,020	0,020
	4	1	1	0	2	0,007	0,013
	5	1	0	0	1	0,007	0,007
	SUMME	8	2	0	10		
CPA-2-Tage	6	73	54	2	129	0,500	0,860
	7	37	24	1	62	0,253	0,413
	8	25	13	0	38	0,167	0,253
	9	19	9	0	28	0,127	0,187
	10	22	16	1	39	0,153	0,260
	SUMME	176	116	4	296		
CPA-4-Tage	11	25	5	0	30	0,167	0,200
	12	11	5	0	16	0,073	0,107
	13	55	31	5	91	0,400	0,607
	14	8	2	0	10	0,053	0,067
	15	26	15	0	41	0,173	0,273
	SUMME	125	58	5	188		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 31: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 91 Tage in Alkohol

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	6	3	0	9	0,040	0,060
	3	3	0	0	3	0,020	0,020
	4	5	4	0	9	0,033	0,060
	5	3	1	0	4	0,020	0,027
	SUMME	18	8	0	26		
CPA-2-Tage	6	94	60	3	157	0,647	1,047
	7	63	31	2	96	0,433	0,640
	8	46	25	0	71	0,307	0,473
	9	23	11	2	36	0,167	0,240
	10	28	8	4	40	0,213	0,267
	SUMME	254	135	11	400		
CPA-4-Tage	11	22	2	0	24	0,147	0,160
	12	4	1	0	5	0,027	0,033
	13	52	17	5	74	0,380	0,493
	14	4	3	1	8	0,033	0,053
	15	34	10	3	47	0,247	0,313
	SUMME	116	33	9	158		

Legende: siehe Tabelle 27

8.2.1.1.3. Carnoy-Fixierung und alkoholische H&E-Färbung**Tab. 32:** 1 Tag Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	2	0	0	2	0,013	0,013
	3	5	3	0	8	0,033	0,053
	4	1	1	0	2	0,007	0,013
	5	1	0	0	1	0,007	0,007
	SUMME	10	4	0	14		
CPA-2-Tage	6	37	53	1	91	0,253	0,607
	7	23	25	0	48	0,153	0,320
	8	21	15	0	36	0,140	0,240
	9	16	13	0	29	0,107	0,193
	10	10	9	0	19	0,067	0,127
	SUMME	107	115	1	223		
CPA-4-Tage	11	21	8	1	30	0,147	0,200
	12	8	2	0	10	0,053	0,067
	13	29	9	2	40	0,207	0,267
	14	8	6	0	14	0,053	0,093
	15	24	9	3	36	0,180	0,240
	SUMME	90	34	6	130		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 33: 7 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchs- tiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	3	1	0	4	0,020	0,027
	2	1	0	0	1	0,007	0,007
	3	1	1	0	2	0,007	0,013
	4	0	0	0	0	0,000	0,000
	5	1	1	0	2	0,007	0,013
	SUMME	6	3	0	9		
CPA-2-Tage	6	40	24	0	64	0,267	0,427
	7	26	14	3	43	0,193	0,287
	8	26	19	2	47	0,187	0,313
	9	8	2	0	10	0,053	0,067
	10	9	5	0	14	0,060	0,093
	SUMME	109	64	5	178		
CPA-4-Tage	11	7	9	1	17	0,053	0,113
	12	2	2	0	4	0,013	0,027
	13	18	16	4	38	0,147	0,253
	14	4	2	0	6	0,027	0,040
	15	18	6	0	24	0,120	0,160
	SUMME	49	35	5	89		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 34: 28 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchs- tiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	3	0	0	3	0,020	0,020
	2	1	0	0	1	0,007	0,007
	3	1	0	0	1	0,007	0,007
	4	2	1	0	3	0,013	0,020
	5	0	0	0	0	0,000	0,000
	SUMME	7	1	0	8		
CPA-2-Tage	6	57	33	0	90	0,380	0,600
	7	24	6	2	32	0,173	0,213
	8	21	10	1	32	0,147	0,213
	9	7	1	0	8	0,047	0,053
	10	8	2	1	11	0,060	0,073
	SUMME	117	52	4	173		
CPA-4-Tage	11	9	6	0	15	0,060	0,100
	12	4	1	0	5	0,027	0,033
	13	31	4	5	40	0,240	0,267
	14	3	0	1	4	0,027	0,027
	15	14	3	2	19	0,107	0,127
	SUMME	61	14	8	83		

Legende: siehe Tabelle 27

Tab. 35: 92 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	1	0	2	0,007	0,013
	2	0	0	0	0	0,000	0,000
	3	1	2	0	3	0,007	0,020
	4	3	0	0	3	0,020	0,020
	5	1	0	0	1	0,007	0,007
	SUMME	6	3	0	9		
CPA-2-Tage	6	55	39	5	99	0,400	0,660
	7	16	20	2	38	0,120	0,253
	8	14	5	0	19	0,093	0,127
	9	10	4	0	14	0,067	0,093
	10	8	4	0	12	0,053	0,080
	SUMME	103	72	7	182		
CPA-4-Tage	11	17	2	1	20	0,120	0,133
	12	8	3	1	12	0,060	0,080
	13	34	4	0	38	0,227	0,253
	14	5	4	1	10	0,040	0,067
	15	14	4	1	19	0,100	0,127
	SUMME	78	17	4	99		

Legende: siehe Tabelle 27

8.2.1.2. Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)

Tab. 36: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes - H&E-Färbung (Standard- bzw. alkoholische H&E-Färbung)

Fixierungsmittel	Fixierungszeit (in Tagen)	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (Geometrische Mittelwerte)		
		Kontrolle	CPA-2-Tage	CPA-4-Tage
reines Formaldehyd	1	0,020	0,246	0,131
	28	0,012	0,321	0,151
	92	0,012	0,281	0,145
Formaldehyd/ Alkohol	1	0,015	0,264	0,152
	28	0,012	0,337	0,188
	92	0,027	0,459	0,134
Carnoy	1	0,013	0,258	0,152
	28	0,009	0,160	0,079
	92	0,010	0,174	0,118

CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

8.2.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

8.2.2.1. Einzeltierdaten

8.2.2.1.1. Intensität der Färbung der TUNEL-positiven apoptotischen Zellen und Körperchen

8.2.2.1.1.1. Reine Formaldehyd-Fixierung

Tab. 37: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	9	0	0	9	100,00	0	0
	2	6	0	0	6	100,00	0	0
	3	5	0	0	5	100,00	0	0
	4	4	0	0	4	100,00	0	0
	5	2	1	0	3	66,67	33,33	0
	SUMME	26	1	0	27	96,30	3,70	0
CPA-2-Tage	6	72	28	0	100	72,00	28,00	0
	7	64	17	0	81	79,01	20,99	0
	8	69	9	0	78	88,46	11,54	0
	9	23	3	0	26	88,46	11,54	0
	10	28	6	1	35	80,00	17,14	2,86
	SUMME	256	63	1	320	80,00	19,69	0,31
CPA-4-Tage	11	26	5	0	31	83,87	16,13	0
	12	3	6	0	9	33,33	66,67	0
	13	48	0	0	48	100,00	0	0
	14	20	2	0	22	90,91	9,09	0
	15	40	1	0	41	97,56	2,44	0
	SUMME	137	14	0	151	90,73	9,27	0

TUNEL - terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Tab. 38: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	1	0	0	1	100,00	0	0
	2	2	0	0	2	100,00	0	0
	3	7	0	0	7	100,00	0	0
	4	4	0	0	4	100,00	0	0
	5	4	0	1	5	80,00	0	20,00
	SUMME	18	0	1	19	94,74	0	5,26
CPA-2-Tage	6	53	47	0	100	53,00	47,00	0
	7	67	19	0	86	77,91	22,09	0
	8	49	9	0	58	84,48	15,52	0
	9	64	7	0	71	90,14	9,86	0
	10	19	4	0	23	82,61	17,39	0
	SUMME	252	86	0	338	74,56	25,44	0
CPA-4-Tage	11	25	7	2	34	73,53	20,59	5,88
	12	11	2	0	13	84,62	15,38	0
	13	34	10	1	45	75,56	22,22	2,22
	14	7	3	0	10	70,00	30,00	0
	15	35	10	0	45	77,78	22,22	0
	SUMME	112	32	3	147	76,19	21,77	2,04

Legende: siehe Tabelle 38

Tab. 39: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	2	0	0	2	100,00	0	0
	2	3	0	0	3	100,00	0	0
	3	2	0	0	2	100,00	0	0
	4	1	1	0	2	50,00	50,00	0
	5	1	0	0	1	100,00	0	0
	SUMME	9	1	0	10	90,00	10,00	0
CPA-2-Tage	6	54	44	0	98	55,10	44,90	0
	7	21	15	4	40	52,50	37,50	10
	8	24	23	0	47	51,06	48,94	0
	9	16	14	0	30	53,33	46,67	0
	10	17	16	0	33	51,52	48,48	0
	SUMME	132	112	4	248	53,23	45,16	1,61
CPA-4-Tage	11	8	16	2	26	30,77	61,54	7,69
	12	4	3	0	7	57,14	42,86	0
	13	36	17	0	53	67,92	32,08	0
	14	22	3	0	25	88,00	12,00	0
	15	17	18	0	35	48,57	51,43	0
	SUMME	87	57	2	146	59,59	39,04	1,37

Legende: siehe Tabelle 38

8.2.2.1.1.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung

Tab. 40: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 2,5 Tage in Alkohol

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	3	1	0	4	75,00	25,00	0
	2	4	0	0	4	100,00	0	0
	3	3	0	0	3	100,00	0	0
	4	5	2	0	7	71,43	28,57	0
	5	1	0	0	1	100,00	0	0
	SUMME	16	3	0	19	84,21	15,79	0
CPA-2-Tage	6	122	25	1	148	82,43	16,89	0,68
	7	74	15	0	89	83,15	16,85	0
	8	74	5	0	79	93,67	6,33	0
	9	49	5	0	54	90,74	9,26	0
	10	33	6	2	41	80,49	14,63	4,88
	SUMME	352	56	3	411	85,64	13,63	0,73
CPA-4-Tage	11	29	8	0	37	78,38	21,62	0
	12	13	1	0	14	92,86	7,14	0
	13	61	8	0	69	88,41	11,59	0
	14	13	3	0	16	81,25	18,75	0
	15	25	6	0	31	80,65	19,35	0
	SUMME	141	26	0	167	84,43	15,57	0

Legende: siehe Tabelle 35

Tab. 41: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	2	0	0	2	100,00	0	0
	2	1	1	0	2	50,00	50,00	0
	3	1	0	0	1	100,00	0	0
	4	4	0	0	4	100,00	0	0
	5	2	0	0	2	100,00	0	0
	SUMME	10	1	0	11	90,91	9,09	0
CPA-2-Tage	6	139	5	0	144	96,53	3,47	0
	7	70	4	0	74	95,89	5,41	0
	8	52	17	0	69	75,36	24,64	0
	9	42	11	0	53	79,25	20,75	0
	10	42	12	0	54	77,78	22,22	0
	SUMME	345	49	0	394	87,79	12,44	0
CPA-4-Tage	11	45	3	0	48	93,75	6,25	0
	12	13	4	0	17	76,47	23,53	0
	13	78	14	2	94	82,98	14,89	2,13
	14	20	1	0	21	95,24	4,76	0
	15	45	1	0	46	97,83	2,17	0
	SUMME	201	23	2	226	88,94	10,18	0,88

Legende: siehe Tabelle 38

Tab. 42: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 91 Tage in Alkohol

Versuchs- tiergruppe	Tier-Nr.	TUNEL-positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)				Prozentualer Anteil (von Summe)		
		deutlich	schwach	sehr schwach	SUMME	deutlich	schwach	sehr schwach
Kontrolle	1	3	0	0	3	100,00	0	0
	2	10	1	0	11	90,91	9,09	0
	3	6	0	1	7	85,71	0	14,29
	4	8	2	0	10	80,00	20,00	0
	5	6	1	0	7	85,71	14,29	0
	SUMME	33	4	1	38	86,84	10,53	2,63
CPA-2-Tage	6	92	40	0	132	69,70	30,30	0
	7	64	31	1	96	66,67	32,29	1,04
	8	51	24	0	75	68,00	32,00	0
	9	30	15	0	45	66,67	33,33	0
	10	25	23	3	51	49,02	45,10	5,88
	SUMME	262	133	4	399	65,66	33,33	1,00
CPA-4-Tage	11	14	8	1	23	60,87	34,78	4,35
	12	4	8	0	12	33,33	66,67	0
	13	31	30	0	61	50,82	49,18	0
	14	2	8	0	10	20,00	80,00	0
	15	18	18	2	38	47,37	47,37	5,26
	SUMME	69	72	3	144	47,92	50,00	2,08

Legende: siehe Tabelle 38

8.2.2.1.2. Apoptose-Indizes (AI) der Einzeltiere in Prozent

Tab. 43: Apoptose-Indizes (AI) der Einzeltiere in Prozent – TUNEL-Methode

Fixierungsmittel	Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	AI [%]		
			Fixierungszeit in Tagen		
			1 Tag	28 Tage	92 Tage
reines Formaldehyd	Kontrolle	1	0,060	0,007	0,013
		2	0,040	0,013	0,020
		3	0,033	0,047	0,013
		4	0,027	0,027	0,013
		5	0,020	0,033	0,007
	CPA-2-Tage	6	0,667	0,667	0,653
		7	0,540	0,573	0,267
		8	0,520	0,387	0,313
		9	0,173	0,473	0,200
		10	0,233	0,153	0,220
	CPA-4-Tage	11	0,207	0,227	0,173
		12	0,060	0,087	0,047
		13	0,320	0,300	0,353
		14	0,147	0,067	0,167
		15	0,273	0,300	0,233
Formaldehyd/ Alkohol	Kontrolle	1	0,027	0,013	0,020
		2	0,027	0,013	0,073
		3	0,020	0,007	0,047
		4	0,047	0,027	0,067
		5	0,007	0,013	0,047
	CPA-2-Tage	6	0,987	0,960	0,880
		7	0,593	0,493	0,640
		8	0,527	0,460	0,500
		9	0,360	0,353	0,300
		10	0,273	0,360	0,340
	CPA-4-Tage	11	0,247	0,320	0,153
		12	0,093	0,113	0,080
		13	0,460	0,627	0,407
		14	0,107	0,140	0,067
		15	0,207	0,307	0,253

AI [%] - Apoptose-Index in Prozent; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug;
CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

8.2.2.1.3. TUNEL-positive und -negative Apoptosen

8.2.2.1.3.1. Reine Formaldehyd-Fixierung

Tab. 44: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	9	0	9	0,00
	2	6	0	6	0,00
	3	5	0	5	0,00
	4	4	0	4	0,00
	5	3	1	4	25,00
	SUMME	27	1	28	3,57
CPA-2-Tage	6	100	4	104	3,85
	7	81	2	83	2,41
	8	78	2	80	2,50
	9	26	0	26	0,00
	10	35	1	36	2,78
	SUMME	320	9	329	2,74
CPA-4-Tage	11	31	1	32	3,13
	12	9	1	10	10,00
	13	48	1	49	2,04
	14	22	0	22	0,00
	15	41	1	42	2,38
	SUMME	151	4	155	2,58

TUNEL - terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Tab. 45: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	1	0	1	0,00
	2	2	0	2	0,00
	3	7	0	7	0,00
	4	4	0	4	0,00+
	5	5	0	5	0,00
	SUMME	19	0	19	0,00
CPA-2-Tage	6	100	10	110	9,09
	7	86	2	88	2,27
	8	58	1	59	1,69
	9	71	0	71	0,00
	10	23	2	25	8,00
	SUMME	338	15	353	4,25
CPA-4-Tage	11	34	5	39	12,82
	12	13	0	13	0,00
	13	45	4	49	8,16
	14	10	0	10	0,00
	15	45	1	46	2,17
	SUMME	147	10	157	6,37

Legende: siehe Tabelle 45

Tab. 46: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	2	1	3	33,33
	2	3	0	3	0,00
	3	2	0	2	0,00
	4	2	0	2	0,00
	5	1	1	2	50,00
	SUMME	10	2	12	16,67
CPA-2-Tage	6	98	7	105	6,67
	7	40	4	44	9,09
	8	47	3	50	6,00
	9	30	5	35	14,29
	10	33	2	35	5,71
	SUMME	248	21	269	7,81
CPA-4-Tage	11	26	6	32	18,75
	12	7	0	7	0,00
	13	53	10	63	15,87
	14	25	0	25	0,00
	15	35	1	36	2,78
	SUMME	146	17	163	10,43

Legende: siehe Tabelle 45

8.2.2.1.3.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung**Tab. 47:** 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 3,5 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	4	0	4	0,00
	2	4	0	4	0,00
	3	3	0	3	0,00
	4	7	0	7	0,00
	5	1	0	1	0,00
	SUMME	19	0	19	0,00
CPA-2-Tage	6	148	5	153	3,27
	7	89	3	92	3,26
	8	79	0	79	0,00
	9	54	0	54	0,00
	10	41	0	41	0,00
	SUMME	411	8	419	1,91
CPA-4-Tage	11	37	0	37	0,00
	12	14	1	15	6,67
	13	69	0	69	0,00
	14	16	6	22	27,27
	15	31	3	34	8,82
	SUMME	167	10	177	5,65

Legende: siehe Tabelle 45

Tab. 48: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	2	0	2	0,00
	2	2	0	2	0,00
	3	1	0	1	0,00
	4	4	0	4	0,00
	5	2	0	2	0,00
	SUMME	11	0	11	0,00
CPA-2-Tage	6	144	3	147	2,04
	7	74	1	75	1,33
	8	69	0	69	0,00
	9	53	2	55	3,64
	10	54	1	55	1,82
	SUMME	394	7	401	1,75
CPA-4-Tage	11	48	0	48	0,00
	12	17	0	17	0,00
	13	94	2	96	2,08
	14	21	0	21	0,00
	15	46	0	46	0,00
	SUMME	226	2	228	0,88

Legende: siehe Tabelle 45

Tab. 49: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 91 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	Tier-Nr.	Apoptosen (pro 15 000 bzw. 75 000 Zellen)			TUNEL-negative Apoptosen [%]
		TUNEL-positiv	TUNEL-negativ	SUMME	
Kontrolle	1	3	0	3	0,00
	2	11	0	11	0,00
	3	7	0	7	0,00
	4	10	0	10	0,00
	5	7	0	7	0,00
	SUMME	38	0	38	0,00
CPA-2-Tage	6	132	7	139	5,04
	7	96	3	99	3,03
	8	75	4	79	5,06
	9	45	0	45	0,00
	10	51	6	57	10,53
	SUMME	399	20	419	4,77
CPA-4-Tage	11	23	3	26	11,54
	12	12	1	13	7,69
	13	61	6	67	8,96
	14	10	2	12	16,67
	15	38	9	47	19,15
	SUMME	144	21	165	12,73

Legende: siehe Tabelle 45

8.2.2.1.4. Weitere TUNEL positive Signale (TUNEL-positive Apoptosen, TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten und TUNEL-positive nicht-Hepatozyten)

8.2.2.1.4.1. Reine Formaldehyd-Fixierung

Tab. 50: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB	
Kontrolle	9	0 / 1	0,00 / 11,11	11,11	32
	6	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	36
	5	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	22
	4	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	9
	3	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	12
SUMME	27	0 / 1	0,00 / 3,70	3,70	111
CPA-2-Tage	100	6 / 13	6,00 / 13,00	19,00	16
	81	3 / 4	3,70 / 4,94	8,64	23
	78	6 / 1	7,69 / 1,28	8,97	31
	26	3 / 2	11,54 / 7,69	19,23	14
	35	2 / 3	5,71 / 8,57	14,29	20
SUMME	320	20 / 23	6,25 / 7,19	13,44	104
CPA-4-Tage	31	2 / 1	6,45 / 3,23	9,68	28
	9	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	3
	48	6 / 3	12,50 / 6,25	18,75	32
	22	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	27
	41	2 / 0	4,88 / 0,00	4,88	28
SUMME	151	10 / 4	6,62 / 2,65	9,27	118

TUNEL - terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; AB - Apoptotisches Körperchen; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Tab. 51: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB	
Kontrolle	1	1 / 0	100,00/ 0,00	100,00	13
	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	18
	7	3 / 1	42,86 / 14,29	57,14	16
	4	1 / 0	25,00 / 0,00	25,00	7
	5	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	7
SUMME	19	5 / 1	26,32 / 5,26	31,58	61
CPA-2-Tage	100	13 / 4	13,00 / 4,00	17,00	7
	86	6 / 3	6,98 / 3,49	10,47	10
	58	4 / 4	6,90 / 6,90	13,79	9
	71	11 / 9	15,49 / 12,68	28,17	10
	23	4 / 2	17,39 / 8,70	26,09	8
SUMME	338	38 / 22	11,24 / 6,51	17,75	44
CPA-4-Tage	34	0 / 1	0,00 / 2,94	2,94	12
	13	4 / 0	30,77 / 0,00	30,77	13
	45	0 / 1	0,00 / 2,22	2,22	8
	10	0 / 1	0,00 / 10,00	10,00	17
	45	2 / 7	4,44 / 15,56	20,00	21
SUMME	147	6 / 10	4,08 / 6,80	10,88	71

Legende: siehe Tabelle 51

Tab. 52: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB	
Kontrolle	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	7
	3	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	11
	2	0 / 1	0,00 / 50,00	50,00	6
	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	6
	1	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	6
SUMME	10	0 / 1	0,00 / 10,00	10,00	36
CPA-2-Tage	98	6 / 7	6,12 / 7,14	13,27	6
	40	0 / 1	0,00 / 2,50	2,50	5
	47	4 / 4	8,51/ 8,51	17,02	7
	30	1 / 2	3,33 / 6,67	10,00	6
	33	1 / 0	3,03 / 0,00	3,03	5
SUMME	248	12 / 14	4,84 / 5,65	10,48	29
CPA-4-Tage	26	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	10
	7	2 / 0	28,57 / 0,00	28,57	8
	53	1 / 4	1,89 / 7,55	9,43	11
	25	4 / 4	16,00 / 16,00	32,00	18
	35	1 / 2	2,86 / 5,71	8,57	9
SUMME	146	8 / 10	5,48 / 6,85	12,33	56

Legende: siehe Tabelle 51

8.2.2.1.4.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung

Tab. 53: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 3,5 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB (pro 100 Apoptosen)	
Kontrolle	4	1 / 1	25,00 / 25,00	50,00	24
	4	0 / 2	0,00 / 50,00	50,00	17
	3	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	11
	7	0 / 1	0,00 / 14,29	14,29	12
	1	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	14
SUMME	19	1 / 4	5,26 / 21,05	26,32	78
CPA-2-Tage	148	17 / 11	11,49 / 7,43	18,92	19
	89	13 / 9	14,61 / 10,11	24,72	19
	79	16 / 9	20,25 / 11,39	31,65	23
	54	6 / 3	11,11 / 5,56	16,67	12
	41	3 / 2	7,32 / 4,88	12,20	18
SUMME	411	55 / 34	13,38 / 8,27	21,65	91
CPA-4-Tage	37	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	20
	14	0 / 3	0,00 / 21,43	21,43	11
	69	4 / 1	5,80 / 1,45	7,25	25
	16	2 / 1	12,50 / 6,25	18,75	3
	31	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	9
SUMME	167	6 / 5	3,59 / 2,99	6,59	68

Legende: siehe Tabelle 51

Tab. 54: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB	
Kontrolle	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	12
	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	23
	1	1 / 0	100,00 / 0,00	100,00	3
	4	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	7
	2	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	19
SUMME	11	1 / 0	9,09 / 0,00	9,09	64
CPA-2-Tage	144	12 / 5	8,33 / 3,47	11,81	22
	74	8 / 2	10,81 / 2,70	13,51	16
	69	6 / 1	8,70 / 1,45	10,14	0
	53	2 / 5	3,77 / 9,43	13,21	8
	53	5 / 1	9,26 / 1,85	11,11	10
SUMME	394	33 / 14	8,38 / 3,55	11,93	56
CPA-4-Tage	48	3 / 2	6,25 / 4,17	10,42	16
	17	1 / 1	5,88 / 5,88	11,76	12
	94	7 / 5	7,45 / 5,32	12,77	20
	21	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	8
	46	3 / 4	6,52 / 8,70	15,22	19
SUMME	226	14 / 12	6,19 / 6,31	11,50	75

Legende: siehe Tabelle 51

Tab. 55: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 91 Tage in Alkohol

Versuchstier- gruppe	TUNEL- positive Apoptosen (pro 15 000 Zellen)	TUNEL-positive morphologisch unveränderte Hepatozyten			TUNEL- positive nicht- Hepatozyten (pro 15 000 Zellen)
		ohne / mit AB (pro 15 000 Zellen)	ohne / mit AB (pro 100 Apoptosen)	ohne + mit AB	
Kontrolle	3	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	11
	11	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	23
	7	0 / 1	0,00 / 14,29	14,29	19
	10	0 / 0	0,00 / 0,00	0,00	17
	7	1 / 0	14,29 / 0,00	14,29	6
SUMME	38	1 / 1	2,63 / 2,63	5,26	76
CPA-2-Tage	132	12 / 13	9,09 / 9,85	18,94	11
	96	2 / 1	2,08 / 1,04	3,13	11
	75	7 / 0	9,33 / 0,00	9,33	15
	45	1 / 5	2,22 / 11,11	13,33	11
	51	2 / 2	3,92 / 3,92	7,84	9
SUMME	399	24 / 21	6,02 / 5,26	11,28	57
CPA-4-Tage	23	0 / 2	0,00 / 8,70	8,70	6
	12	1 / 0	8,33 / 0,00	8,33	6
	61	4 / 1	6,56 / 1,64	8,20	18
	10	1 / 0	10,00 / 0,00	10,00	3
	38	2 / 1	5,26 / 2,63	7,89	8
SUMME	144	8 / 4	5,56 / 2,78	8,33	41

Legende: siehe Tabelle 51

8.2.2.2. Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)

Tab. 56: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes – TUNEL-Methode

Fixierungsmittel	Fixierungszeit (in Tagen)	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (Geometrische Mittelwerte)		
		Kontrolle	CPA-2-Tage	CPA-4-Tage
rein Formaldehyd	1	0,034	0,376	0,174
	28	0,021	0,404	0,164
	92	0,013	0,299	0,162
Formaldehyd/ Alkohol	1	0,022	0,497	0,188
	28	0,013	0,488	0,250
	92	0,046	0,492	0,153

CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

8.2.3. Eosinfluoreszenz-Methode (alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung)

8.2.3.1. Einzeltierdaten - Apoptotische Zellen und Körperchen (mit und ohne Chromatin) sowie Apoptose-Indizes (in Prozent)

Tab. 57: 1 Tag Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	1	0	0	1	0,007	0,007
	2	2	0	0	2	0,013	0,013
	3	4	3	0	7	0,027	0,047
	4	0	1	0	1	0,000	0,007
	5	0	0	0	0	0,000	0,000
	SUMME	7	4	0	11		
CPA-2-Tage	6	27	53	0	80	0,180	0,533
	7	19	25	0	44	0,127	0,293
	8	18	15	0	33	0,120	0,220
	9	14	13	0	27	0,093	0,180
	10	7	9	0	16	0,047	0,107
	SUMME	85	115	0	200		
CPA-4-Tage	11	20	8	0	28	0,133	0,187
	12	6	2	0	8	0,040	0,053
	13	21	9	0	30	0,140	0,200
	14	5	5	0	10	0,033	0,067
	15	19	9	0	28	0,127	0,187
	SUMME	71	33	0	104		

AB - Apoptotisches Körperchen; AC - Apoptotische Zelle; AI [%] - Apoptose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente; CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

Tab. 58: 7 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	3	1	0	4	0,020	0,027
	2	1	0	0	1	0,007	0,007
	3	1	1	0	2	0,007	0,013
	4	0	0	0	0	0,000	0,000
	5	0	1	0	1	0,000	0,007
	SUMME	5	3	0	8		
CPA-2-Tage	6	29	24	0	53	0,193	0,353
	7	17	14	0	31	0,113	0,207
	8	19	19	0	38	0,127	0,253
	9	5	2	0	7	0,033	0,047
	10	7	5	0	12	0,047	0,080
	SUMME	77	64	0	141		
CPA-4-Tage	11	4	9	0	13	0,027	0,087
	12	1	2	0	3	0,007	0,020
	13	12	16	0	28	0,080	0,187
	14	3	2	0	5	0,020	0,033
	15	14	6	0	20	0,093	0,133
	SUMME	34	35	0	69		

Legende: siehe Tabelle 58

Tab. 59: 28 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	2	0	0	2	0,013	0,013
	2	1	0	0	1	0,007	0,007
	3	0	0	0	0	0,000	0,000
	4	1	1	0	2	0,007	0,013
	5	0	0	0	0	0,000	0,000
	SUMME	4	1	0	5		
CPA-2-Tage	6	37	33	0	70	0,247	0,467
	7	9	6	0	15	0,060	0,100
	8	12	9	0	21	0,080	0,140
	9	6	1	0	7	0,040	0,047
	10	5	2	0	7	0,033	0,047
	SUMME	69	51	0	120		
CPA-4-Tage	11	4	6	0	10	0,027	0,067
	12	1	1	0	2	0,007	0,013
	13	18	4	0	22	0,120	0,147
	14	2	0	0	2	0,013	0,013
	15	10	3	0	13	0,067	0,087
	SUMME	35	14	0	49		

Legende: siehe Tabelle 58

Tab. 60: 92 Tage Fixierung in Carnoy

Versuchstiergruppe	Tier-Nr.	AB (pro 15 000 Zellen)		AC	SUMME (AB+AC)	AI [%]	
		mit CH	ohne CH			mit CH	SUMME (AB+AC)
Kontrolle	1	0	1	0	1	0,000	0,007
	2	0	0	0	0	0,000	0,000
	3	0	2	0	2	0,000	0,013
	4	1	0	0	1	0,007	0,007
	5	0	0	0	0	0,000	0,000
	SUMME	1	3	0	4		
CPA-2-Tage	6	28	35	0	63	0,187	0,420
	7	10	20	0	30	0,067	0,200
	8	8	4	0	12	0,053	0,080
	9	3	4	0	7	0,020	0,047
	10	6	4	0	10	0,040	0,067
	SUMME	55	67	0	122		
CPA-4-Tage	11	8	2	0	10	0,053	0,067
	12	1	3	0	4	0,007	0,027
	13	12	4	0	16	0,080	0,107
	14	3	4	0	7	0,020	0,047
	15	6	4	0	10	0,040	0,067
	SUMME	30	17	0	47		

Legende: siehe Tabelle 58

8.2.3.2. Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (geometrische Mittelwerte)

Tab. 61: Geometrische Mittelwerte der Apoptose-Indizes - Eosinfluoreszenz

Fixierungsmittel	Fixierungszeit (in Tagen)	Apoptose-Indizes der Versuchstiergruppen (Geometrische Mittelwerte)		
		Kontrolle	CPA-2-Tage	CPA-4-Tage
Carnoy	1	0,010	0,231	0,120
	7	0,008	0,147	0,068
	28	0,007	0,108	0,043
	92	0,006	0,116	0,057

CPA - Cyproteronacetat; CPA-2-Tage - zwei Tage CPA-Entzug; CPA-4-Tage - vier Tage CPA-Entzug

8.3. Anstiegsfaktoren der Apoptose-Indizes

Tab. 62: Anstiegsfaktoren der Apoptose-Indizes in den Lebern der behandelten Tiere (CPA-2- bzw. CPA-4-Tage) im Vergleich zu den Kontrollen.

Fixierungs- mittel	Methode Fixierungszeit (in Tagen)	Tage nach CPA-Entzug	Anstiegsfaktor		
			95%ige Vertrauensbereiche		geom. MW
			Untergrenze	Obergrenze	
reines Formaldehyd	H&E 1	2	5,12	28,80	12,15
		4	2,45	16,91	6,44
	H&E 28	2	12,43	59,90	27,29
		4	5,01	32,91	12,85
	H&E 92	2	8,93	63,81	23,88
		4	3,82	39,53	12,29
	TU 1	2	5,33	23,57	11,20
		4	2,31	11,61	5,18
	TU 28	2	7,23	52,51	19,49
		4	2,69	23,35	7,92
	TU 92	2	12,87	44,41	23,90
		4	5,43	30,84	12,94
Formaldehyd/ Alkohol	H&E 1	2	6,32	50,21	17,81
		4	3,76	28,02	10,26
	H&E 28	2	12,33	63,49	27,98
		4	5,57	43,89	15,63
	H&E 92	2	5,62	52,46	17,17
		4	1,12	22,47	5,01
	TU 1	2	9,45	55,54	22,92
		4	3,22	23,28	8,66
	TU 28	2	19,22	70,08	36,70
		4	7,89	44,75	18,80
	TU 92	2	5,26	21,30	10,59
		4	1,28	8,49	3,30
Carnoy	H&E 1	2	6,75	54,56	19,19
		4	3,90	32,63	11,27
	H&E 28	2	4,86	61,29	17,27
		4	2,41	29,91	8,49
	H&E 92	2	5,07	53,98	16,54
		4	4,39	28,78	11,25
	EF 1	2	7,04	74,52	22,91
		4	3,55	39,74	11,88
	EF 28	2	4,82	52,05	15,84
		4	1,65	24,18	6,31
	EF 92	2	6,53	57,30	19,35
		4	4,38	20,70	9,52

CPA - Cyproteronacetat; geom. MW - geometrischer Mittelwert; H&E - Hämatoxylin-Eosin-Färbung; TU – terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling; EF - Eosinfluoreszenz

8.4. Tabellen zu den Ergebnissen aus dem Nachweis der Nekrosen mit der H&E-Färbung (Standard- und alkoholische H&E-Färbung), der TUNEL- und der Eosinfluoreszenz-Methode

8.4.1. Einzeltierdaten - Nekrotische Zellen (mit und ohne Chromatin) sowie Nekrose-Indizes (in Prozent)

8.4.1.1. Standard-Lichtmikroskopie (Standard und alkoholische Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung

8.4.1.1.1. Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung

Tab. 63: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	63	58	121	52,07	0,420	0,807
17	75	53	128	58,59	0,500	0,853
18	35	25	60	58,33	0,233	0,400
19	342	184	526	65,02	2,280	3,507
20	99	52	151	65,56	0,660	1,007
SUMME	614	372	986	62,27		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 64: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	68	41	109	62,39	0,453	0,727
17	54	37	91	59,34	0,360	0,607
18	26	17	43	60,47	0,173	0,287
19	455	311	766	59,40	3,033	5,107
20	262	175	437	59,95	1,747	2,913
SUMME	865	581	1446	59,82		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 65: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	76	69	145	52,41	0,507	0,967
17	105	61	166	63,25	0,700	1,107
18	38	35	73	52,05	0,253	0,487
19	339	278	617	54,94	2,260	4,113
20	132	75	207	63,77	0,880	1,380
SUMME	690	518	1208	57,12		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

8.4.1.1.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung**Tab. 66:** 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 2,5 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	61	42	103	59,22	0,407	0,687
17	64	54	118	52,24	0,427	0,787
18	28	27	55	50,91	0,187	0,367
19	337	221	558	60,39	2,247	3,720
20	167	86	253	66,01	1,113	1,687
SUMME	657	430	1087	60,44		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 67: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	61	37	98	62,24	0,407	0,653
17	88	55	143	61,54	0,587	0,953
18	60	29	89	67,42	0,400	0,593
19	412	208	620	66,45	2,747	4,133
20	270	143	413	65,38	1,800	2,753
SUMME	891	472	1363	65,37		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 68: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 91 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	99	76	175	56,57	0,660	1,167
17	68	52	120	56,67	0,453	0,800
18	52	43	95	54,74	0,347	0,633
19	570	411	981	58,10	3,800	6,540
20	132	61	193	68,39	0,880	1,287
SUMME	921	643	1564	58,89		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

8.4.1.1.3. Carnoy-Fixierung und alkoholische-H&E-Färbung**Tab. 69:** 1 Tag Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	115	77	192	59,90	0,767	1,280
17	48	55	103	46,60	0,320	0,687
18	45	30	75	60,00	0,300	0,500
19	344	313	657	52,36	2,293	4,380
20	116	57	173	67,05	0,773	1,153
SUMME	668	532	1200	55,67		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 70: 7 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	115	75	190	60,53	0,767	1,267
17	75	56	131	57,25	0,500	0,873
18	26	22	48	54,17	0,173	0,320
19	392	362	754	51,99	2,613	5,027
20	170	114	284	59,86	1,133	1,893
SUMME	778	629	1407	55,29		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 71: 28 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	84	54	138	60,87	0,560	0,920
17	89	52	141	63,12	0,593	0,940
18	38	19	57	66,67	0,253	0,380
19	300	287	587	51,11	2,000	3,913
20	184	132	316	58,23	1,227	2,107
SUMME	695	544	1239	56,09		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 72: 92 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	106	80	186	56,99	0,707	1,240
17	53	35	88	60,23	0,353	0,587
18	26	18	44	59,09	0,173	0,293
19	377	299	676	55,77	2,513	4,507
20	226	128	354	63,84	1,507	2,360
SUMME	788	560	1348	58,46		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

8.4.1.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL)

8.4.1.2.1. Reine Formaldehyd-Fixierung und Standard-H&E-Färbung

Tab. 73: 1 Tag reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	42	49	91	0,607
17	7	0	7	0,047
18	9	11	20	0,133
19	31	41	72	0,480
20	34	10	44	0,293
SUMME	123	111	234	

NI [%] = Nekrose-Index in Prozent

Tab. 74: 28 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	35	24	59	0,393
17	28	21	49	0,327
18	8	5	13	0,087
19	130	105	235	1,567
20	14	8	22	0,147
SUMME	215	163	378	

NI [%] = Nekrose-Index in Prozent

Tab. 75: 92 Tage reine Fixierung in Formaldehyd

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	62	44	106	0,707
17	37	27	64	0,427
18	19	21	40	0,267
19	50	38	88	0,587
20	68	62	130	0,867
SUMME	236	192	428	

NI [%] = Nekrose-Index in Prozent

8.4.1.2.2. Formaldehyd/Alkohol-Fixierung und Standard-H&E-Färbung**Tab. 76:** 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 2,5 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	34	32	66	0,440
17	32	18	50	0,333
18	21	9	30	0,200
19	76	43	119	0,793
20	43	21	64	0,427
SUMME	206	123	329	

NI [%] = Nekrose-Index in Prozent

Tab. 77: 1 Tag Fixierung in Formaldehyd und anschließend 27 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	36	34	70	0,467
17	16	16	32	0,213
18	15	25	40	0,267
19	48	36	84	0,560
20	47	47	94	0,627
SUMME	162	158	320	

NI - Nekrose-Index; [%] = in Prozent

Tab. 78: 1 Tag Fixation in Formaldehyd und anschließend 92 Tage in Alkohol

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)			NI [%] SUMME
	granulär positiv	granulär und diffus positiv	SUMME	
16	46	10	56	0,373
17	55	16	71	0,473
18	32	11	43	0,287
19	61	14	75	0,500
20	52	21	73	0,487
SUMME	246	72	318	

NI - Nekrose-Index; [%] = in Prozent

8.4.1.3. Eosinfluoreszenz-Methode und Carnoy-Fixierung

Tab. 79: 1 Tag Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	73	66	139	52,52	0,487	0,927
17	31	51	82	37,80	0,207	0,547
18	19	19	38	50,00	0,127	0,253
19	187	255	442	42,31	1,247	2,947
20	62	43	105	59,05	0,413	0,700
SUMME	372	434	806	46,15		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 80: 7 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	60	52	112	53,57	0,400	0,747
17	45	46	91	49,45	0,300	0,607
18	15	14	29	51,72	0,100	0,193
19	190	305	495	38,38	1,267	3,300
20	86	81	167	51,50	0,573	1,113
SUMME	396	498	894	44,30		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 81: 28 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	44	38	82	53,66	0,293	0,547
17	57	47	104	54,81	0,380	0,693
18	15	9	24	62,50	0,100	0,160
19	195	257	452	43,14	1,300	3,013
20	115	120	235	48,94	0,767	1,567
SUMME	426	471	897	47,49		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

Tab. 82: 92 Tage Fixierung in Carnoy

Tier-Nr.	Nekrosen (pro 15 000 Zellen)				NI [%]	
	mit CH	ohne CH	SUMME (mit und ohne CH)	mit CH (in %)	mit CH	SUMME (mit und ohne CH)
16	52	65	117	44,44	0,347	0,780
17	31	33	64	48,44	0,207	0,427
18	10	11	21	47,62	0,067	0,140
19	231	265	496	46,57	1,540	3,307
20	143	115	258	55,43	0,953	1,720
SUMME	467	489	956	48,85		

NI [%] - Nekrose-Index in Prozent; CH - Chromatinfragmente

8.4.2. Nekrose-Indizes der Versuchstiergruppen

Tab. 84: Geometrische Mittelwerte der Nekrose-Indizes – Standard- und alkoholische H&E-Färbung

Fixierungsmittel	Nekrose-Indizes (Geometrische Mittelwerte) Fixierungszeit (in Tagen)		
	1	28	92
rein Formaldehyd	0,994	1,135	1,242
Formaldehyd/ Alkohol	1,045	1,332	1,378
Carnoy	1,173	1,221	1,178

Tab. 85: Geometrische Mittelwerte der Nekrose-Indizes - TUNEL-Methode

Fixierungsmittel	Nekrose-Indizes (Geometrische Mittelwerte) Fixierungszeit (in Tagen)		
	1	28	92
rein Formaldehyd	0,222	0,304	0,528
Formaldehyd/ Alkohol	0,397	0,393	0,415

Tab. 86: Geometrische Mittelwerte der Nekrose-Indizes – Eosinfloureszenz-Methode

Fixierungsmittel	Nekrose-Indizes (Geometrische Mittelwerte) Fixierungszeit (in Tagen)		
	1	28	92
Carnoy	0,767	0,779	0,767

8.5. Eingesetzte Materialien

8.5.1. Fixierung und Paraffinierung

- Carnoysches Gemisch:

6 Teile	Ethanol (100%)
3 Teile	Chloroform
1 Teil	Essigsäure (99,5-100 %)

- 19-Stunden-Programm für die Einbettung von Organproben fixiert in reinem Formaldehyd bzw. Formaldehyd/Alkohol:

<u>Zeit in Stunden</u>	<u>Medium</u>
3 x 1,5	70%iges Ethanol
2 x 1,5	96%iges Ethanol
2 x 1,5	100%iges Ethanol
2 x 1,5	Xylol
1 x 1,5	Paraplast (Schmelzpunkt 58 ⁰ C-62 ⁰ C)
2 x 2,0	Paraplast (Schmelzpunkt 58 ⁰ C-62 ⁰ C)

- 11-Stunden-Programm für die Einbettung von Organproben fixiert in Carnoy:

<u>Zeit in Stunden</u>	<u>Medium</u>
3 x 1,5	100%iges Ethanol
2 x 1,5	Xylol
2 x 1,5	Paraplast (Schmelzpunkt 58 ⁰ C-62 ⁰ C)
1 x 0,5	Paraplast (Schmelzpunkt 58 ⁰ C-62 ⁰ C)

8.5.2. Lösungen, Puffer, Bezugsquellen

8.5.2.1. Lösungen und Puffer

Hämatoxylin nach Mayer (saures Hämalalaun):

1 g Hämatoxylin lösen in: 1000 ml Aqua bidest.

50 g	Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)
50 g	Chloralhydrat
1 g	Zitronensäure

Die Reifung erfolgt durch Zugabe von 200 mg Natriumjodat (NaJO₃)

Hämatoxylin nach Ehrlich (saures Hämalalaun)

12 g Hämatoxylin lösen in: 600 ml 96%igem Ethanol
600 ml Aqua bidest.
600 ml Glycerin reinst
18 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)
($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
60 ml Essigsäure konz.

Die Reifung erfolgt durch Zugabe von 2,4 g Natriumjodat (NaJO_3).

Wässrige Eosin Farblösung (0,5%):

10 g Eosin gelblich (Certistain®, Merck) in 2 l Aqua dest. lösen
20 ml 40%iges ungepuffertes Formalin zugeben

Alkoholische Eosin-Farblösung (0,4 %)

0,8 g Eosin gelblich (Certistain®, Merck)
200 ml 60%iges Ethanol

Die Eosinlösung vor Gebrauch filtrieren.

Für die Konzentrationsreihe des Vorversuchs erfolgte eine entsprechende Umrechnung der eingesetzten Eosinmenge.

Schiffsches Reagens (= Fuchsin basisch)

0,5 g Pararosanilin acridinfrei lösen in 15 ml 1N HCL
0,5 g Kaliummetabisulfit lösen in 85 ml Aqua dest.

Beide Lösungen mischen und in einem gut verschlossenen Kolben 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahren.

300 mg Aktivkohle zugeben und ca. 5 Minuten schütteln.

Anschließend 48 Stunden im Kühlschrank aufbewahren und anschließend filtrieren.
Die Lösung muss farblos sein.

Alkoholische Perjodsäure-Lösung

- 0,2 M Natriumacetat-Lösung:

Natriumacetat	1,36 g
Aqua dest.	50 ml

- 4%ige Perjodsäure-Lösung:

Perjodsäure	2 g
Aqua dest.	50 ml

- Ethanol 100%ig

Ein Gemisch herstellen aus:

0,2 M Natriumacetat-Lösung	10 ml
4%iger Perjodsäure-Lösung	20 ml
100%igem Ethanol	70 ml

Oil-Red-O nach Lillie (Stammlösung)

5 g Oil-Red-O in 1000 ml reinem Isopropanol lösen

Oil-Red-O nach Lillie (Gebrauchslösung)

600 ml Stammlösung

400 ml Aqua bidest.

24 Stunden stehen lassen, dann filtrieren

Fast Red-Gebrauchslösung (BioGenex)

Unmittelbar vor Gebrauch eine Tablette Fast Red in 5 ml Substratlösung (Naphthol Phosphat gelöst in Tris-Puffer (BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA) auflösen.

PBS-Puffer (OptiMax™ Wash Buffer (20X)

Verdünnung 1:20 in Aqua bidest.

pH 7,4 +/- 0,2

Tris/HCl (Sigma) = TBS-Puffer

0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, mit 0,15 M NaCl

Salzsäureethanol 0,5%ig

995 ml 70%iges Ethanol
5 ml Salzsäure 32%ig

8.5.2.2. Bezugsquellen**BASF**, Ludwigshafen

Aqua bidest.
Formaldehyd, 4%

Becker und Co., Castrop-Rauxel

Drahtkäfig - Typ DK III

BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA

Concentrated Phosphate Buffered Saline (PBS)
Fast Red Substrate Pack (HK 182-5K)
Levamisol, 50x concentrate (HK 113-5K)
Pap-Pen, hydrophobic slide marker (XT 001 PP)

Boehringer, Mannheim

In Situ Cell Detection Kit, AP

Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss

Wistar-Ratten, Zuchtstamm: Chbb: THOM (SPF)

Feather

Einmalmesser, Microtom Blades S35

Fluka Chemika, Buchs, Schweiz

Chloroform

Klingentalmühle AG, Kaiseraugst, Schweiz

Kliba - Haltungsdiät (Ratte-Maus-Hamster)

Leica (ehemals Leitz), Lorsch

Orthoplan-Mikroskop
Bildanalysesystem Q500MC

Medite, Medizintechnik, Burgdorf

Färbeautomat COT 20
Pertex (Eindeckungsmedium)
Promounter RCM 90 (Eindeckautomat)

Merck, Darmstadt

Certistain® (Eosin, gelblich)
Chloralhydrat (102425)
Chloroform
Essigsäure reinst 96% (100058)
Glycerin
Isopropanol
Kaisers Glyceringelatine für die Mikrowelle (1.09242.0100)
Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)
Kaliummetabitsulfit
Natriumacetat, wasserfrei zur Analyse (106268)
Natriumjodat zur Analyse (106525)
Oil-Red-O-Lilli
Paraplast, Pastillen, Schmelzpunkt 56-58⁰C
Pararosanilin (107509)
Perjodsäure zur Analyse (100524)
Salzsäure 37%
Zitronensäure, wasserfrei (100247)

Microm, Walldorf

HM 355 (Rotationsmikrotom)

Pfälzische Spritfabrik, Ludwigshafen

Ethanol 100%
Xylol

PSI (Pool of Scientific Instruments) Grünewald, Laudenbach

Kühlplatte
Starfrost Objektträger

Riedel-de Haen, Seelze

Aceton p.A. 32201
Tetrachlorkohlenstoff

Schering AG, Berlin

Cyproteronacetat

Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt

2L Processor MK II
Shandon Histocentre (Einbettautomat)

Sigma, Molecular Sigma Biology

Protease from *Streptomyces griseus* (Lot No. 117H1022; Product No. P6911)
Tris/HCl
Pararosanilin

Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss

Wistar-Ratten-Zuchtstamm: Chbb:Thom (SPF)

9. Literaturverzeichnis

ADACHI, M.; SUEMATSU, S.; KONDO, T.; OGASWARA, J.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NAGATA, S. (1995):

Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver.

Nature Genet. 11: 294-300

ADAMS, J. M.; CORY, S. (1998):

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.

Science 281: 1322-1326

AGARWAL, A. K.; MEHENDALE, H. M. (1983):

Potentiation of CCl₄ hepatotoxicity and lethality by chlordecone in female rats.

Toxicology 26: 231-242

ALEXANDROW, M. G.; MOSES, H. L. (1995):

Transforming growth factor β and cell cycle regulation.

Cancer Res. 55: 1452-1457

ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. (1995):

Apoptosis: regulation and relevance to toxicology.

Hum. Exp. Toxicol. 14: 234-247

ALLBRITTON, N. L.; VERRET, C. R.; WOLLEY, R. C.; EISEN, H. N. (1988):

Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes.

J. Exp. Med. 167: 514-527

ANSARI, B.; COATES, P. J.; GREENSTEIN, B. D.; HALL, P. A. (1993):

In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological states.

J. Pathol. 170: 1-8

ANTONSSON, B.; CONTI, F.; CIAVATTA, A.; MONTESSUIT, S.; LEWIS, S.; MARTINOU, I.; BERNASCONI, L.; BERNARD, A.; MERMOD J.-J.; MAZZEI, G.; MAUNDRELL, K.; GAMBALE, F.; SADOUL, R.; MARTINOU, J.-C. (1997):

Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2.

Science 277: 370-372

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. (1990):

Apoptosis. The role of the endonuclease.

Am. J. Pathol. 136: 593-608

ARENDS, M. J.; WYLLIE, A. H. (1991):

Apoptosis: mechanisms and roles in pathology.

Int. Rev. Exp. Pathol. 32: 223-254

BAFFY, G.; MIYASHITA, T.; WILLIAMSON, J. R.; REED, J. C. (1993):

Apoptosis induced by withdrawal of Interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production.

J. Biol. Chem. 268: 6511-6519

BAHNEMANN, R.; MELLERT, W. (1997):

Lobule-dependent zonal measurement (LZM) method for the determination of cell proliferation in the liver.

Exp. Toxicol. Pathol. 49: 189-196

BEG, A. A.; BALTIMORE, D. (1996):

An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death.

Science 274: 782-784

BENEDETTI, A.; JEZEQUEL, A. M.; ORLANDI, F. (1988a):

A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver.

Liver 8: 172-177

BENEDETTI, A.; JEZEQUEL, A. M.; ORLANDI, F. (1988b):

Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver.

J. Hepatol. 7: 319-324

BERKE, G. (1995):

Unlocking the secrets of CTL and NK cells.

Immunol. Today 16: 343-346

- BLAZEY, B.; HEUSER, A.; BAHNEMANN, R.; REINACHER, M. (1999):
Cell proliferation and apoptotic index in rat liver – 5 non-genotoxic compounds in comparison.
17th meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP), Nantes, France
- BOISE, L. H.; GONZÁLEZ-GARCIA, M.; POSTEMA, C. E.; DING, L.; LINDSTEN, T.; TURKA, L. A.; MAO, X.; NUNEZ, G.; THOMPSON, C. B. (1993):
bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.
Cell 74: 597-608
- BOIVIN, G. P.; O'TOOLE, B. A.; ORSMBY, I. E.; DIEBOLD, R. J.; EIS, M. J.; DOETSCHMAN, T.; KIER, A. B. (1995):
Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor- β 1-deficient mice.
Am. J. Pathol. 146: 276-288
- BOLDIN, M. P.; METT, I. L.; VARFOLOMEEV, E. E.; CHUMAKOV, I., CHEMER-AVNI, Y.; CAMONIS, J. H.; WALLACH, D. (1995a):
Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO 1 prompts signaling for TNF and Fas/APO 1 effects.
J. Biol. Chem. 270: 387-391
- BOLDIN, M. P.; VARFOLOMEEV, E. E.; PANCER, Z.; METT, I. L.; CAMONIS, J. H.; WALLACH, D. (1995b):
A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO 1 contains a sequence motif related to the death domain.
J. Biol. Chem. 270: 7795-7798
- BOLDIN, M. P.; GONCHAROV, T. M.; GOLTSEV, Y. V.; WALLACH, D. (1996):
Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF- receptor-induced cell death.
Cell 85: 803-815
- BOLENDER, R. P.; WEIBEL, E. R. (1973):
A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment.
J. Cell Biol. 56: 746-761

BOLLON, A. P.; BERENT, S. L.; TORCZYNSKI, R. M.; HILL, N. O.; LEMESHEV, Y.; HILL, J. M.; JIA, F. L.; JOHER, A.; PICHYANGKUL, S.; KHAN, A. (1988):

Human cytokines, tumor necrosis factor, and interferons: gene cloning, animal studies, and clinical trials.

J. Cell. Biochem. 36: 353-367

BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. (1991):

Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa.

Nature 350: 429-431

BROMIDGE, T. J.; HOWE, D. J.; JOHNSON, S. A.; PHILLIPS, M. J. (1995):

Adaptation of the TdT assay for semi-quantitative flow cytometric detection of DNA strand breaks.

Cytometry 20: 257-260

BRONSON, R. T. (1981):

Ultrastructure of macrophages and karyolytic bodies in small intestinal villi of macaque monkeys and baboons.

Vet. Pathol. 18: 727-737

BRUCKNER, J. U.; MacKENZIE, W. F.; MURALIDHARA, S.; LUTHRA, R.; KYLE, G. M.; ACOSTA, D. (1986):

Oral toxicity of carbon tetrachloride: acute, subacute and subchronic studies in rats.

Fundam. Appl. Toxicol. 6: 16-34

BUCHER, O.; WARTENBERG, H. (1991):

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen

11. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto

BURCK, H. C. (1988):

Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis.

6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

BURKHARDT, S. (2001):

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen Karzinogenen.

Inaugural-Diss. Vet.-Med., Gießen

BURSCH, W.; LAUER, B.; TIMMERMAN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; SCHUPPLER, J.; SCHULTE-HERMANN, R. (1984):

Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.

Carcinogenesis 5: 453-458

BURSCH, W.; TAPER, H. S.; LAUER, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1985):

Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia.

Virchows Arch. (Cell Pathol.) 50: 153-166

BURSCH, W.; DÜSTERBERG, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1986):

Growth, regression and cell death in rat liver as related to tissue levels of the hepatomitogen cyproterone acetate.

Arch. Toxicol. 59: 221-227

BURSCH, W.; PAFPE, S.; PUTZ, B.; BARTHEL, G.; SCHULTE-HERMANN, R. (1990):

Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats.

Carcinogenesis 11: 847-853

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. (1992):

Cell death by apoptosis and its protective role against disease.

Trends Pharmacol. Sci. 13: 245-251

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; JIRTLE, R. L.; ASKARI, M.; SEDIVY, R.; GRASL-KRAUPP, B.; PURCHIO, A. F.; SCHULTE-HERMANN, R. (1993):

Transforming growth factor- β_1 as a signal for induction of cell death by apoptosis.

Br. J. Cancer 67: 531-536

BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B.; ELLINGER, A.; TÖRÖK, L.; KIENZL, H.; MÜLLAUER, L.; SCHULTE-HERMANN, R. (1994):

Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes.

Biochem. Cell Biol. 72: 669-675

BURSCHE, W.; ELLINGER, A.; KIENZL, H.; TÖRÖK, L.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M.; WALKER, R.; SCHULTE-HERMANN, R. (1996):

Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy.

Carcinogenesis 17: 1595-1607

BURSCHE, W.; ELLINGER, A.; GERNER, C.; FROHWEIN, U.; SCHULTE-HERMANN, R. (2000):

Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?

Ann. N Y Acad. Sci. 926: 1-12

CARLE, B. N. (1981):

Autofluorescence in the identification of myocardial infarcts.

Hum. Pathol. 12: 643-646

CARR, B. I.; HAYASHI, I.; BRANUM, E. L.; MOSES, H. L. (1986):

Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived Type β Transforming growth factor.

Cancer Res. 46: 2330-2334

CARR, B. I.; HUANG, T. H.; ITAKURA, K.; NOEL, M.; MARCEAU, N. (1989):

TGF beta gene transcription in normal and neoplastic liver growth.

J. Cell Biochem. 39: 477-487

CHAPMAN, R. S.; CHRESTA, C. M.; HERBERG, A. A.; BEERE, H. M.; HEER, S.; WHETTON, A. D.; HICKMAN, J. A.; DIVE, C. (1995):

Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells.

Cytometry 20: 245-256

CHARLOTTE, F.; L'HERMINÉ, A.; MARTIN, N.; GELEYN, Y.; NOLLET, M.; GAULARD, P.; ZAFRANI, E. S. (1994):

Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver.

Am. J. Pathol. 144: 460-465

- CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V. M. (1995):
FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.
Cell 81: 505-512
- CHINNAIYAN, A. M.; ORTH, K.; O'ROURKE, K.; DUAN, H.; POIRIER, G. G.; DIXIT, V. M. (1996):
Molecular ordering of the cell death pathway: bcl-2 and bcl-x_L function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases.
J. Biol. Chem. 271: 4573-4576
- CHITTENDEN, T.; HARRINGTON, E. A.; O'CONNOR, R.; FLEMINGTON, C.; LUTZ, R. J.; EVAN, G. I.; GUILD, B. C. (1995):
Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak.
Nature 374: 733-736
- CHO, Y.; GORINA, S.; JEFFREY, P. D.; PAVLETICH, N. P. (1994):
Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.
Science 265: 346-355
- CLEARY, M. L.; SMITH, S. D.; SKLAR, J. (1986):
Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation.
Cell 47: 19-28
- CLEVELAND, J. L.; IHLE, J. N. (1995):
Contenders in FasL/TNF death signaling.
Cell 81: 479-482
- COHEN, J. J.; DUKE, R. C. (1984):
Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death.
J. Immunol. 132: 38-42
- COLLINS, R. J.; HARMON, B. V.; GOBE, G. C.; KERR, J. F. R. (1992):
Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis.
Int. J. Radiat. Biol. 61: 451-453

COLLINS, J. A.; SCHANDL, C. A.; YOUNG, K. K.; VESELY, J.; WILLINGHAM, M. C. (1997):

Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis.

J. Histochem. Cytochem. 45: 923-934

CONSTAN, A. A.; BENJAMIN, S. A.; TESSARI, J. D.; BAKER, D. C.; YANG, R. S. H. (1996):

Increased rate of apoptosis correlates with hepatocellular proliferation in Fischer-344 rats following long-term exposure to a mixture of groundwater contaminants.

Toxicol. Pathol. 24: 315-322

CORY, S.; VAUX, D. L.; STRASSER, A.; HARRIS, A. W.; ADAMS, J. M. (1999):

Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation.

Cancer Res. (Suppl.) 59: 1685s-1692s

COSTERO, I.; POMERAT, C. M. (1951):

Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex.

Am. J. Anat. 89: 405-468

DARMON, A. J.; NICHOLSON, D. W.; BLEACKLEY, R. C. (1995):

Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B.

Nature 377: 446-448

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. (1992):

Features of apoptotic cells measured by flow cytometry.

Cytometry 13: 795-808

DAVISON, F. D.; GROVES, M.; SCARAVILLI, F. (1995):

The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by *in situ* end labelling of DNA.

Histochem. J. 27: 983-988

DETER, R. L. (1971):

Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole, and acid phosphatase-bearing particle populations during the early phases of glucagon-induced autophagy in rat liver.

J. Cell Biol. 48: 473-489

DIAZ, C.; SCHROIT, A. J. (1996):

Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry.

J. Membrane Biol. 151: 1-9

DIXON, W. J. (chief editor), (1993):

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. (1997):

Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death.

Am. J. Pathol. 151: 1205-1213

DOUGLAS, R. S.; TARSHIS, A. D.; PLETCHER, C. H., Jr.; NOWELL, P. C.; MOORE, J. S. (1995):

A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes.

J. Immunol. Meth. 188: 219-228

DUAN, H.; CHINNAIYAN, A. M.; HUDSON, P. L.; WING, J. P.; HE, W.-W.; DIXIT, V. M. (1996):

ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis.

J. Biol. Chem. 271: 1621-1625

DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D.-E. (1997):

Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord.

Spektrum der Wissenschaft, Februar: 26-35

EARNSHAW, W. C. (1999):

Apoptosis. A cellular poison cupboard.

Nature 397: 387-389

EISENSMITH, S. P. (1993):

PlotIT - Graphics & Statistics.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, Michigan, USA

EI-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.
Cell 75: 817-825

ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. (1986):
Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.
Cell 44: 817-829

ELLIS, R. E.; YUAN, J. Y.; HORVITZ, H. R. (1991):
Mechanisms and functions of cell death.
Annu. Rev. Cell Biol. 7: 663-698

ENARI, M.; HUG, H.; NAGATA, S. (1995):
Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis.
Nature 375: 78-81

ESPADA, J.; VALVERDE, P.; STOCKERT, J. C. (1993):
Selective fluorescence of eosinophilic structures in grasshopper and mammalian testis stained with haematoxylin-eosin.
Histochemistry 99: 385-390

EWEN, M. E.; SLUSS, H. K.; WHITEHOUSE, L. L.; LIVINGSTON, D. M. (1993):
TGF β inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest.
Cell 74: 1009-1020

FARBER, E. (1994):
Programmed cell death: necrosis *versus* apoptosis.
Modern Pathol. 7: 605-609

FASCIATI, R.; MAIER, P. (1997):
EGF- and CPA-induced mitogenic stimuli are differentially downregulated by TGF- β 1 in cultured rat hepatocytes.
Carcinogenesis 18: 911-917

FEHSEL, K.; KRÖNCKE, K. D.; KOLB, H. KOLB-BACHHOFEN, V. (1994):
In situ nick-translation detects focal apoptosis in thymuses of glucocorticoid- and lipopolysaccharide-treated mice.
J. Histochem. Cytochem. 42: 613-619

FELDMANN, G. (1997):

Liver apoptosis.

J. Hepatol. 26 (Suppl. 2): 1-11

FOSTER, J. R. (2000):

Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth.

Toxicol. Pathol. 28: 441-446

FRASER, A.; EVAN, G. (1996):

A license to kill.

Cell 85: 781-784

FRIDOVICH, I. (1995):

Superoxide radical and superoxide dismutases.

Annu. Rev. Biochem. 64: 97-112

FUCHS, J. E.; McKENNA, K. A.; BEDI, A. (1997):

p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32 β .

Cancer Res. 57: 2550-2554

GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A.; REUTTER, W. R. (1979):

Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5939-5943

GAULARD, P.; D'AGAY, M. F.; PEUCHMAUR, M.; BROUSSE, N.; GISSELBRECHT, C.; SOLAL-CELIGNY, P.; DIEBOLD, J. (1992):

Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma.

Am. J. Pathol. 140: 1089-1095

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. (1992):

Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.

J. Cell Biol. 119: 493-501

GENG, Y.; WEINBERG, R. A. (1993):

Transforming growth factor β effects on expression of G₁ cyclins and cyclin-dependent protein kinases.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 10315-10319

GLÜCKSMANN, A. (1930):

Über die Bedeutung von Zellvorgängen für die Formbildung epithelialer Tumoren.

Z. Anat. Entwicklungsgesch. 93: 35-92

GOLD, R.; SCHMIED, M.; ROTHE, G.; ZISCHLER, H.; BREITSCHOPF, H.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. (1993):

Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections.

J. Histochem. Cytochem. 41: 1023-1030

GOLDIN, R. D.; HUNT, N. C.; CLARK, J.; WICKRAMASINGHE, S. N. (1993):

Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: reversibility of ethanol-induced changes.

J. Pathol. 171: 73-76

GOLDSTEIN, D. (1969):

The fluorescence of elastic fibres stained with eosin and excited by visible light.

Histochem. J. 1: 187-198

GOLDSWORTHY, T. L.; FRANSSON-STEEN, R. L.; MOSER, G. J. (1995):

Assessing proliferation and apoptosis in liver tumor development.

Chemical Industry Institute of Toxicology, CIIT Activities 15: 1-9

GOLDSWORTHY, T. L.; CONOLLY, R. B.; FRANSSON-STEEN, R. (1996a):

Apoptosis and cancer risk assessment.

Mutation Res. 365: 71-90

GOLDSWORTHY, T. L.; FRANSSON-STEEN, R.; MARONPOT, R. R. (1996b):

Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis.

Toxicol. Pathol. 24: 24-35

GONZÁLEZ-AMARO, R.; GARCIA-MONZÓN, C.; GARCIA-BUEY, L.; MORENO-OTERO, R.; ALONSO, J. L.; YAGÚE, E.; PIVEL, J. P.; LÓPEZ-CABRERA, M.; FERNANDEZ-RUIZ, E.; SÁNCHEZ-MADRID, F. (1994):

Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis.

J. Exp. Med. 179: 841-848

GORCZYCA, W.; BIGMAN, K.; MITTELMAN, A.; AHMED, T.; GONG, J.; MELAMED, M. R.; DARZYNKIEWICZ, Z. (1993a):

Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias.

Leukemia 7: 659-670

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. (1993b):

Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays.

Cancer Res. 53: 1945-1951

GRAEBER, T. G.; PETERSON, J. F.; TSAI, M.; MONICA, K.; FORNACE, A. J., Jr.; GIACCIA, A. J. (1994):

Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G₁-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status.

Mol. Cell. Biol. 14: 6264-6277

GRAEBER, T. G.; OSMANIAN, C.; JACKS, T.; HOUSMAN, D. E.; KOCH, C. J.; LOWE, S. W.; GIACCIA, A. J. (1996):

Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours.

Nature 379: 88-91

GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1994):

Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonises carcinogenesis in rat liver.

Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91: 9995-9999

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. (1995):

In situ detection of fragmented DNA (TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.

Hepatology 21: 1465-1468

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; MÜLLAUER, L.; TAPER, H.; HUBER, W.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. (1997):

Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression.

Hepatology 25: 906-912

GREEN, D. R.; REED, J. C. (1998):

Mitochondria and apoptosis.

Science 281: 1309-1312

GREENBERG, J. T.; GUO, A.; KLESSING, D. F.; AUSUBEL, F. M. (1994):

Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defence functions.

Cell 77: 551-563

GREENBLATT, M. S.; ELIAS, L. (1992):

The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U937 cells and differentiation in HL-60 cells.

Blood 80: 1339-1346

GRIFFITH, T. S.; LYNCH, D. H. (1998):

TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms.

Curr. Opin. Immunol. 10: 559-563

GRIFFITH, T. S.; CHIN, W. A.; JACKSON, G. C.; LYNCH, D. H.; KUBIN, M. Z. (1998):

Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells.

J. Immunol. 161: 2833-2840

GROSS, A.; McDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. (1999a):

BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.

Genes Dev. 13: 1899-1911

GROSS, A.; YIN, X.-M.; WANG, K.; WEI, M. C.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; KORSMEYER, S. J. (1999b):

Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.

J. Biol. Chem. 274: 1156-1163

GURA, T. (1997):

How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells.

Science 277: 768

HALDAR, S.; JENA, N.; CROCE, C. M. (1995):

Inactivation of bcl-2 by phosphorylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92: 4507-4511

HALDAR, S.; CHINTAPALLI, J.; CROCE, C. M. (1996):

Taxol-induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells.

Cancer Res. 56: 1253-1255

HALDAR, S.; BASU, A.; CROCE, C. M. (1997):

Bcl2 is the guardian of microtubule integrity.

Cancer Res. 57: 229-233

HARLAND, R. M.; WEINTRAUB, H.; McKNIGHT, S. L. (1983):

Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology.

Nature 302: 38-43

HARRINGTON, E. A.; FANIDI, A.; EVAN, G. I. (1994):

Oncogenes and cell death.

Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 120-129

HAYASHI, N.; MITA, E. (1999):

Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis.

J. Viral Hep. 6: 357-365

HEDGECOCK, E. M.; SULSTON, J. E.; THOMSON, J. N. (1983):

Mutations affecting programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Science 220: 1277-1279

HENGARTNER, M. O.; ELLIS, R. E.; HORVITZ, H. R. (1992):

Caenorhabditis elegans gene *ced-9* protects cells from programmed cell death.

Nature 356: 494-499

HENGARTNER, M. O.; HORVITZ, H. R. (1994):

C. elegans cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*.

Cell 76: 665-676

HEUSER, A. (2000):

Vergleich der promovierenden Wirkung fünf nicht-genotoxischer Karzinogene auf präneoplastische Herde in der Wistar-Rattenleber.

Inaugural-Diss. Vet.-Med., Gießen

HIGAKI, K.; YANO, H.; KOJIRO, M. (1996):

Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues.

Am J. Pathol. 149: 429-437

HIGAMI, Y.; SHIMOKAWA, I.; OKIMOTO, T.; TOMITA, M.; YUO, T.; IKEDA, T. (1996):

Susceptibility of hepatocytes to cell death induced by single administration of cycloheximide in young and old F344 rats. Effect of dietary restriction.

Mutation Res. 357: 225-230

HIGAMI, Y.; SHIMOKAWA, I.; OKIMOTO, T.; TOMITA, M.; YUO, T.; IKEDA, T. (1997a):

Effect of aging and dietary restriction on hepatocyte proliferation and death in male F344 rats.

Cell Tissue Res. 288: 69-77

HIGAMI, Y.; SHIMOKAWA, I.; TOMITA, M.; OKIMOTO, T.; KOJI, T.; KOBAYASHI, N.; IKEDA, T. (1997b):

Aging accelerates but life-long dietary restriction suppresses apoptosis-related Fas expression on hepatocytes.

Am. J. Pathol. 151: 659-663

HIRAMATSU, N.; HAYASHI, N.; KATAYAMA, K.; MOCHIZUKI, K.; KAWANISHI, Y.; KASAHARA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. (1994):

Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C.

Hepatology 19: 1354-1359

HOCKENBERY, D. M.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. (1990):

Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.
Nature 348: 334-336

HOCKENBERY, D. M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W.; NAHM, M.; KORSMEYER, S. J. (1991):

Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterised by apoptotic cell death.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 6961-6965

HOCKENBERY, D. M.; OLTVAI, Z. N.; YIN, X.-M.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. (1993):

Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.

Cell 75: 241-251

HOCKENBERY, D. (1995):

Defining Apoptosis.

Am. J. Pathol. 146: 16-19

HORVITZ, H. R.; SHAHAM, S.; HENGARTNER, M. O. (1994):

The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 377-385

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDDEL, D. V. (1995):

The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation.

Cell 81: 495-504

HSU, I. C.; METCALF, R. A.; SUN, T.; WELSH, J. A.; WANG, N. J.; HARRIS, C. C. (1991):

Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas.

Nature 350: 427-428

HUANG, A. S.; WAGNER, R. R. (1965):

Inhibition of cellular RNA synthesis by nonreplicating vesicular stomatitis virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 54: 1579-1584

HUNTER, T. (1993):

Breaking the cycle.

Cell 75: 839-841

IJIRI, K.; POTTEN, C. S. (1983):

Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation.

Br. J. Cancer 47: 175-185

ISHIDA, R.; AKIYOSHI, H.; TAKAHASHI, T. (1974):

Isolation and purification of calcium and magnesium dependent endonuclease from rat liver nuclei.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 703-710

ITO, N.; KAWATA, S.; TAMURA, S.; TAKAISHI, K.; SAITOH, R.; TARUI, S. (1990):

Modulation of c-myc expression by transforming growth factor β 1 in human hepatoma cell lines.

Jpn. J. Cancer Res. 81: 216-219

ITO, Y.; OTSUKI, Y. (1998):

Localisation of apoptotic cells in the human epidermis by an in situ DNA nick end-labeling method using confocal reflectant laser microscopy.

J. Histochem. Cytochem. 46: 783-786

ITOH, N.; YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M.; MIZUSHIMA, S.-I.; SAMESHIMA, M.; HASE, A.; SETO, Y.; NAGATA, S. (1991):

The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.

Cell 66: 233-243

ITOH, N.; NAGATA, S. (1993):

A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen.

J. Biol. Chem. 268: 10932-10937

JÄÄTTELÄ, M. D.; WISSING, D.; BAUER, P. A.; LI, G. C. (1992):

Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.

EMBO J. 11: 3507-3512

JAKOWLEW, S. B.; MEAD, J. E.; DANIELPOUR, D.; WU, J.; ROBERTS, A. B.; FAUSTO, N. (1991):

Transforming growth factor- β isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF β .

Cell Regul. 2: 535-548

JIRTLE, R. L.; MEYER, S. A. (1991):

Liver tumour promotion: effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor-beta 1 expression.

Dig. Dis. Sci. 36: 659-668

JIRTLE, R. L.; CARR, B. I.; SCOTT, C. D. (1991):

Modulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor- β 1 during liver regeneration.

J. Cell Biochem. 266: 22444-22450

JOHNSON, R. T.; MULLINGER, A. M.; SKAER, R. J. (1975):

Perturbation of mammalian cell division human mini segregants derived from mitotic cells.

Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 189: 591-602

JOHNSON, R. T.; MULLINGER, A. M.; DOWNES, C. S. (1978):

Human minisegregant cells.

Methods Cell Biol. 20: 255-314

JOHNSON, T. M.; YU, Z.-X.; FERRANS, V. J.; LOWENSTEIN, R. A.; FINKEL, T. (1996):

Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 11848-11852

JONES, H. B.; CLARKE, N. A. B.; BARRASS, N. C. (1993):

Phenobarbital-induced hepatocellular proliferation: anti-bromodeoxyuridine and anti-proliferating cell nuclear antigen immunocytochemistry.

J. Histochem. Cytochem. 41: 21-27

JU, S.- T.; PANKA, D. J.; CUI, H.; ETTINGER, R.; EL-KHATIB, M.; SHERR, D. H.; STANGER, B. Z.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. (1995):
Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation.

Nature 373: 444-448

JUNGERMANN, K.; KATZ, N. (1989):
Functional specialization of different hepatocyte populations.
Physiol. Rev. 69: 708-764

KAPLOWITZ, N. (2000):
Mechanisms of liver cell injury.
J. Hepatol. 32 (Suppl. 1): 39-47

KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, B.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. (1991):
Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.
Cancer Res. 51: 6304-6311

KERR, J. F. R. (1965):
A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes.
J. Pathol. Bacteriol. 90: 419-435

KERR, J. F. R. (1969):
An electron-microscope study of liver cell necrosis due to heliotrine.
J. Pathol. 97: 557-562

KERR, J. F. R. (1971):
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death.
J. Pathol. 105: 13-20

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. (1972):
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26: 239-257

KERR, J. F. R.; HARMON, B.; SEARLE, J. (1974):

An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers.
J. Cell Sci. 14: 571-585

KIM, M. Y.; LINARDIC, C.; OBEID, L.; HANNUN, Y. (1991):

Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor α and γ -interferon. Specific role in cell differentiation.
J. Biol. Chem. 266: 484-489

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. (1995):

Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.
EMBO J. 14: 5579-5588

KISHIMOTO, M.; UEDA, K.; NAKATA, M.; KONISHI, E.; URATA, Y.; TSUCHIHASHI, Y.; ASHIHARA, T. (1992):

Detection of the DNA strand breaks by in situ nick translation using non-radioactive nucleotide.
Proc. Histochem. Soc. 154

KLIMPEL, G. R.; SHABAN, R.; NIESEL, D. W. (1990):

Bacteria-infected fibroblasts have enhanced susceptibility to the cytotoxic action of tumor necrosis factor.
J. Immunol. 145: 711-717

KLION, F. M.; SCHAFFNER, F. (1966):

The ultrastructure of acidophilic "Councilman-like" bodies in the liver.
Am. J. Pathol. 48: 755-767

KNUDSON, A. G. (1993):

Antioncogenes and human cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 10914-10921

KOCKX, M. M.; MUHRING, J.; KNAAPEN, M. W. M.; DE MAYER, G. R. Y. (1998):

RNA synthesis and splicing interferes with DNA *in situ* end labeling techniques used to detect apoptosis.
Am. J. Pathol. 152: 885-888

KOLAJA, K. L.; BUNTING, K. A.; KLAUNING, J. E. (1996):

Inhibition of tumor promotion and hepatocellular growth by dietary restriction in mice.
Carcinogenesis 17: 1657-1664

KONG, J.; RINGER, D. P. (1995):

Quantitative *in situ* image analysis of apoptosis in well and poorly differentiated tumors from rat liver.

Am. J. Pathol. 147: 1626-1632

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; KUIJTEN, G. A. M.; KEEHNEN, R. M. J.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. J. (1994):

Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.

Blood 84: 1415-1420

KOZOPAS, K. M.; YANG, T.; BUCHAN, H. L.; ZHOU, P.; CRAIG, R. W. (1993):

MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 3516-3520

KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; SHABAIK, A.; MIYASHITA, T.; WANG, H. G.; REED, J. C. (1994):

Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2.

Am. J. Pathol. 145: 1323-1336

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. (1997):

Mitochondrial control of apoptosis.

Immunol. Today 18: 44-51

LABAT-MOLEUR, F.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; ROBERT, C.; LANTUEJOUL, S.; BRAMBILLA, E.; NEGOESCU, A. (1998):

TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement.

J. Histochem. Cytochem. 46: 327-334

LAIHO, M.; DeCAPRIO, J. A.; LUDLOW, J. W.; LIVINGSTON, D. M.; MASSAGUÉ, J. (1990):

Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation.

Cell 62: 175-185

LANE, D. P. (1992):

Cancer. p53, the guardian of the genome.

Nature 358: 15-16

LANE, D. P.; BENCHIMOL, S. (1990):

Cancer. p53: oncogene or anti-oncogene?

Genes Dev. 4: 1-8

LANZEROTTI, R. H.; GULLINO, P. M. (1972):

Activities and quantities of lysosomal enzymes during mammary tumor regression.

Cancer Res. 32: 2679-2685

LASTER, S. M.; WOOD, J. G.; GOODING, L. R. (1988):

Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis.

J. Immunol. 141: 2629-2634

LAUER, B. (1985):

Untersuchungen zur Regression des adaptativen Leberwachstums: Zellelimination durch Apoptose.

Inaugural-Diss. Med., Marburg

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CONI, P.; CURTO, M.; GIACOMINI, L.; FAA, G.; OLIVERIO, S.; PIACENTINI, M.; COLUMBANO, A. (1991):

Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide.

Am. J. Pathol. 139: 1099-1109

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CONI, P.; FAA, G.; MANENTI, G.; COLUMBANO, A. (1992):

Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide.

Am. J. Pathol. 140: 545-549

LEE, G.-H. (1997):

Correlation between bcl-2 expression and histopathology in diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular tumors.

Am. J. Pathol. 151: 957-961

LEIST, M.; GANTNER, F.; BOHLINGER, I.; GERMANN, P. G.; TIEGS, G.; WENDEL, A. (1994):

Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF- α requires transcriptional arrest.

J. Immunol. 153: 1778-1788

LEIST, M.; GANTNER, F.; JILG, S.; WENDEL, A. (1995):

Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrit release.

J. Immunol. 154: 1307-1316

LEIST, M.; GANTNER, F.; NAUMANN, H.; BLUETHMANN, H.; VOGT, K.; BRIGELIUS-FLOHÈ, R.; NICOTERA, P.; VOLK, H.-D.; WENDEL, A. (1997):

Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins.

Gastroenterology 112: 923-934

LEITHÄUSER, F.; DHEIN, J.; MECHTERSHEIMER, G.; KORETZ, K.; BRUDERLEIN, S.; HENNE, C.; SCHMIDT, A.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; MÖLLER, P. (1993):

Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells.

Lab Invest. 69: 415-429

LEVIN, S. (1995):

A toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues.

Toxicol. Pathol. 23: 533-539

LEVINE, A. J.; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. (1994):

The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis.

Br. J. Cancer 69: 409-416

- LI, X.; JAMES, W. M.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. (1995):
Application of biotin, digoxigenin or fluorescein conjugated deoxynucleotides to label DNA strand breaks for analysis of cell proliferation and apoptosis using flow cytometry.
J. Biotech. Histochem. 70: 234-242
- LIBERT, C.; VAN BLADEL, S.; BROUCKAERT, P.; SHAW, A.; FIER, W. (1991):
Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor.
J. Immunol. 146: 2625-2632
- LIN, E. Y.; ORLOFSKY, A.; BERGER, M. S.; PRYSTOWSKY, M. B. (1993):
Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2.
J. Immunol. 151: 1979-1988
- LIU, L. F.; LIU, C. C.; ALBERTS, B. M. (1980):
Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via reversible double-strand break.
Cell 19: 697-707
- LIU, Z.-G.; HSU, H.; GOEDDEL, D. V.; KARIN, M. (1996):
Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death.
Cell 87: 565-576
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C.M. (1965):
Programmed cell death. I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Parnyi silk moth.
J. Insect. Physiol. 11: 123-133
- LOS, M.; VAN DE CRAEN, M.; PENNING, L. C.; SCHENK, H.; WESTENDORP, M.; BAEUERLE, P. A.; DRÖGE, W.; KRAMER, P. H.; FIER, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K. (1995):
Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis.
Nature 375: 81-83

LU, Q.-L.; ELIA, E.; LUCAS, S.; THOMAS, J. A. (1993a):

Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma.

Int. J. Cancer 53: 29-35

LU, Q.-L.; POULSOM, R.; WONG, I.; HANBY, A. M. (1993b):

Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues.

J. Pathol. 169: 431-437

MacCALLUM, D. E.; HUPP, T. R.; MIDGLEY, C. A.; STUART, D.; CAMPBELL, S. J.; HARPER, A.; WALSH, F. S.; WRIGHT, E. G.; BALMAIN, A.; LANE, D. P.; HALL, P. A. (1996):

The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues.

Oncogene 13: 2575-2587

MAJNO, G.; JORIS, I. (1995):

Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.

Am. J. Pathol. 146: 3-15

MANON, S.; CHAUDHURI, B.; GUÉRIN, M. (1997):

Release of cytochrome C and decrease of cytochrome C oxidase in Bax-expressing yeast cells and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL.

FEBS Lett. 415: 29-32

MARSTERS, S. A.; PITTI, R. M.; DONAHUE, C. J.; RUPPERT, S.; BAUER, K. D.; ASHKENAZI, A. (1996):

Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA.

Curr. Biol. 6: 750-752

MARTIN, S. J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; McGAHON, A. J.; RADER, J. A.; VAN SCHIE, R. C. A. A.; LAFACE, D. M.; GREEN, D. R. (1995):

Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl.

J. Exp. Med. 182: 1545-1556

MASSAGUÉ, J. (1987):

The TGF- β family of growth and differentiation factors.

Cell 49: 437-438

MAYOL, X.; NEAL, G. E.; DAVIES, R.; ROMERO, A.; DOMINGO, J. (1992):

Ethinyl estradiol-induced cell proliferation in rat liver. Involvement of specific populations of hepatocytes.

Carcinogenesis 13: 2381-2388

McCONKEY, D. J.; HARTZELL, P.; NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. (1989a):

Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes.

FASEB J. 3: 1843-1849

McCONKEY, D. J.; NICOTERA, P.; HARTZELL, P.; BELLOMO, G.; WYLLIE, A. H.; ORRENIUS, S. (1989b):

Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration.

Arch. Biochem. Biophys. 269: 365-370

McCONKEY, D. J.; HARTZELL, P.; ORRENIUS, S. (1990):

Rapid turnover of endogenous endonuclease activity in thymocytes: effect of inhibitors of macromolecular synthesis.

Arch. Biochem. Biophys. 278: 284-287

McDONALD, R. A. (1961):

"Lifespan" of liver cells.

Arch. Intern. Med. 107: 335-343

McDONNELL, T. J.; TRONCOSO, P.; BRISBAY, S. M.; LOGOTHETIS, C.; CHUNG, L. W. K.; HSIEH, J.-T.; TU, S.-M.; CAMPBELL, M. L. (1992):

Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer.

Cancer Res. 52: 6940-6944

MI, L.-J.; MAK, K. M.; LIEBER, C. S. (2000):

Attenuation of alcohol-induced apoptosis of hepatocytes in rat livers by polyenylphosphatidylcholine (PPC).

Alcohol. Clin. Exp. Res. 24: 207-212

MICHALOPOULOS, G. K. (1990):

Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control.

FASEB J. 4: 176-187

MIETHKE, T.; WAHL, C.; HEEG, K.; ECHTENACHER, B.; KRAMMER, P. H.;
WAGNER, H. (1992):

T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor.

J. Exp. Med. 175: 91-98

MILLS, J. J.; CHARI, R. S.; BOYER, I. J.; GOULD, M. N.; JIRTLE, R. L. (1995):

Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol.

Cancer Res. 55: 979-983

MIYASHITA, T.; REED, J. C. (1995):

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.

Cell 80: 293-299

MONAGHAN, P.; ROBERTSON, D.; AMOS, T. A. S.; DYER, M. J. S.; MASON, D. Y.; GREAVES, M. F. (1992):

Ultrastructural localization of bcl-2 protein.

J. Histochem. Cytochem. 40: 1819-1825

MÜNGER, K.; PIETENPOL, J. A.; PITTELKOW, M. R.; HOLT, J. T.; MOSES, H. L. (1992):

Transforming growth factor β 1 regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes.

Cell Growth Differ. 3: 291-298

MUSKHELISHVILI, L.; HART, R. W.; TURTURRO, A.; JAMES, S. J. (1995):

Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and ad libitum-fed B6C3F1 mice.

Am. J. Pathol. 147: 20-24

MUZIO, M.; CHINNAIYAN, A. M.; KISCHKEL, F. C.; O`ROURKE, K.; SHEVCHENKO, A.; NI, J.; SCAFFIDI, C.; BRETZ, J. D.; ZHANG, M.; GENTZ, R.; MANN, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.; DIXIT, V. M. (1996):

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.

Cell 85: 817-827

NAGAKI, M.; MUTO, Y.; OHNISHI, H.; YASUDA, S.; SANO, K.; NAITO, T.; MAEDA, T.; YAMADA, T.; MORIWAKI, H. (1994):

Hepatic injury and lethal shock in galactosamine-sensitized mice induced by the superantigen staphylococcal enterotoxin B.

Gastroenterology 106: 450-458

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. (1995):

The Fas death factor.

Science 267: 1449-1456

NAGATA, S. (1997):

Apoptosis by death factor.

Cell 88: 355-365

NAGY, P.; EVARTS, R. P.; McMAHON, J. B.; THORGEIRSSON, S. S. (1989):

Role of TGF-beta in normal differentiation and oncogenesis in rat liver.

Mol. Carcinog. 2: 345-354

NAKAMURA, M.; SAKAKI, Y.; WATANABE, N.; TAKAGI, Y. (1981):

Purification and characterization of the Ca^{2+} plus Mg^{2+} -dependent endodeoxyribonuclease from calf thymus chromatin.

J. Biochem. 89: 143-152

NAKAMURA, M.; TOMITA, Y.; HIRAI, R.; YAMAOKA, K.; KAJI, K.; ICHIHARA, A. (1985):

Inhibitory effect of Transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 133: 1042-1050

NAKAMURA, T.; SAKAI, T.; HOTCHI, M. (1995):

Histochemical demonstration of DNA double strand breaks by in situ 3'-tailing reaction in apoptotic endometrium.

J. Biotech. Histochem. 70: 33-39

NAKATSUKASA, H.; NAGY, P.; EVARTS, R. P.; HSIA, C.-C.; MARSDEN, E.; THORGEIRSSON, S. S. (1990):

Cellular distribution of transforming growth factor- β 1 and procollagen types I, II and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis.

J. Clin. Invest. 85: 1833-1843

NEGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E. (1996):

In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations.

J. Histochem. Cytochem. 44: 959-968

NUSSBAUM, M. (1901):

Zur Rückbildung embryonaler Anlagen.

Arch. Mikrosk. Anat. 57: 676-705

OBEID, L. M.; LINARDIC, C. M.; KAROLAK, L. A.; HANNUN, Y. A. (1993):

Programmed cell death induced by ceramide.

Science 259: 1769-1771

OBERHAMMER, F. A.; BURSCH, W.; PARZEFALL, W.; BREIT, P.; ERBER, E.; STADLER, M.; SCHULTE-HERMANN, R. (1991):

Effect of transforming growth factor β on cell death of cultured rat hepatocytes.

Cancer Res. 51: 2478-2485

OBERHAMMER, F. A.; FRITSCH, G.; PAVELKA, M.; FROSCHL, G.; TIEFENBACHER, R.; PURCHIO, T.; SCHULTE-HERMANN, R. (1992a):

Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in the regressing liver by transforming growth factor- β 1 occurs without activation of an endonuclease.

Toxicol. Lett. 64/65: 701-704

OBERHAMMER, F. A.; PAVELKA, M.; SHARMA, S.; TIEFENBACHER, R.; PURCHIO, A. F.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. (1992ba):

Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor β 1.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 5408-5412

OBERHAMMER, F. A.; BURSCH, W.; TIEFENBACHER, R.; FRÖSCHL, G.; PAVELKA, M.; PURCHIO, T. A.; SCHULTE-HERMANN, R. (1993):

Apoptosis is induced by transforming growth factor- β 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA.

Hepatology 18: 1238-1246

OCHS, H.; DÜSTERBERG, B.; GÜNZEL, P.; SCHULTE-HERMANN, R. (1986):

Effect of tumor promoting contraceptive steroids on growth and drug metabolizing enzymes in rat liver.

Cancer Res. 46: 1224-1232

OEHM, A.; BEHRMANN, I.; FALK, W.; PAWLITA, M.; MAIER, G.; KLAS, C.; LI-WEBER, M.; RICHARDS, S.; DHEIN, J.; TRAUTH, B. C.; PONSTING, H.; KRAMMER, P. H. (1992):

Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily.

J. Biol. Chem. 267: 10709-10715

OGASAWARA, J.; WATANABE-FUKUNAGA, R.; ADACHI, M.; MATSUZAWA, A.; KASUGAI, T.; KITAMURA, Y.; ITOH, N.; SUDA, T.; NAGATA, S. (1993):

Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice.

Nature 364: 806-809

OHNO, K.; NAKANO, T.; MATSUMOTO, Y.; WATARI, T.; GOITSUKA, R.; NAKAYAMA, H.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. (1993):

Apoptosis induced by tumor necrosis factor in cells chronically infected with feline immunodeficiency virus.

J. Virol. 67: 2429-2433

OHNO, K.; AMMANN, P.; FASCIATI, R.; MAIER, P. (1995):

Transforming growth factor β 1 preferentially induces apoptotic cell death in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 132: 227-236

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. (1993):

Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.

Cell 74: 609-619

OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. (1994):

Checkpoints of dueling dimers foil death wishes.

Cell 79: 189-192

ORMEROD, M. G.; O'NEILL, C. F.; ROBERTSON, D.; HARRAP, K. R. (1994):

Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA.

Exp. Cell Res. 211: 231-237

ORRENIUS, S.; McCABE, M. J., Jr.; NICOTERA, P. (1992):

Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death.

Toxicol. Lett. 64-65: 357-364

OWEN-SCHAUB, L. B.; ZHANG, W.; CUSACK, J. C.; ANGELO, L. S.; SATEE, S. M.; FUYIWARA, T.; ROTH, J. A.; DEISSEROTH, A. B.; ZHANG, W. W.; KRUZEL, E. (1995):

Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.

Mol. Cell. Biol. 15: 3032-3040

OYAIZU, T.; SHIKATA, N.; SENZAKI, H.; MATSUZAWA, A.; TSUBURA, A. (1997):

Studies on the mechanism of dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice.

Exp. Toxic. Pathol. 49: 375-380

PANI, G.; BEDOGNI, B.; ANZEVINO, R.; COLAVITTI, R.; PALAZZOTTI, B.; BORRELLO, S.; GALEOTTI, T. (2000):

Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells.

Cancer Res. 60: 4654-4660

PENAUULT-LLORCA, F.; BOUABDALLAH, R.; DEVILARD, E.; CHARTON-BAIN, M.-C.; HASSOUN, J.; BIRG, F.; XERRI, L. (1998):

Analysis of BAX expression in human tissues using the anti-BAX, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections.

Pathol. Res. Pract. 194: 457-464

PETERSEN, B.; YEE, C. J.; BOWEN, W.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. (1994):

Distinct morphological and mito-inhibitory effects induced by TGF- β_1 , HGF and EGF on mouse, rat and human hepatocytes.

Cell Biol. Toxicol. 10: 219-230

PFEIFER, U. (1982):

Kinetic and subcellular aspects of hypertrophy and atrophy.

Int. Rev. Exp. Pathol. 23: 1-45

PHILLIPS, T. A.; NI, J.; PAN, G.; RUBEN, S. M.; WEI, Y.-F.; PACE, J. L.; HUNT, J. S. (1999):

TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege.

J. Immunol. 162: 6053-6059

PIERONI, R. E.; BRODERICK, E. J.; BUNDEALLY, A.; LEVINE, L. (1970):

A simple method for the quantitation of submicrogram amounts of bacterial endotoxin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133: 790-794

PIETENPOL, J. A.; HOLT, J. T.; STEIN, R. W.; MOSES, H. L. (1990a):

Transforming growth factor β_1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 3758-3762

PIETENPOL, J. A.; STEIN, R. W.; MORAN, E.; YACIUK, P.; SCHLEGEL, R.; LYONS, R. M.; PITTELKOW, M. R.; MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M.; MOSES, H. L. (1990b):

TGF- β_1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains.

Cell 61: 777-785

PINKOSKI, M. J.; BRUNNER, T.; GREEN, D. R.; LIN, T. (2000):

Fas and Fas ligand in gut and liver.

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278: G354-G366

PITTI, R. M.; MARSTERS, S. A.; RUPPERT, S.; DONAHUE, C. J.; MOORE, A.; ASHKENAZI, A. (1996):

Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family.

J. Biol. Chem. 271: 12687-12690

POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. A. (1997):

A model for p53-induced apoptosis.

Nature 389: 300-305

POREMBA, C.; BANKFALVI, A.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B. (1996):

Das Tumorsuppressorgen p53.

Pathologe 17: 181-188

POTTEN, C. S.; AL-BARWARI, S. E.; SEARLE, J. (1978):

Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells.

Cell Tissue Kinet. 11: 149-160

PRITCHARD, D. J.; BUTLER, W. H. (1989):

Apoptosis - the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity.

J. Pathol. 158: 253-260

PRIVES, C. (1994):

How loops, β sheets, and α helices help us to understand p53.

Cell 78: 543-546

PSCHYREMBEL, W. bearbeitet von ZINK, C. (1991):

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch

256. Auflage, DeGruyter, Berlin, New York

RAFF, M. (1998):

Cell suicide for beginners.

Nature 396: 119-122

RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, Z. J.; LOUGHEED, W. M.; LOTTO, W. N. (1954):
Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.
Anat. Rec. 119: 11-23

RAVI, R.; BEDI, A.; FUCHS, E. J.; BEDI, A. (1998):
CD95 (Fas)-induced Caspase-mediated Proteolysis of NF- κ B.
Cancer Res. 58: 882-886

RAY, S. D.; JENA, N. (2000):
A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X_L, and
BCL-X_S during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo.
Arch. Toxicol. 73: 594-606

RECKLINGHAUSEN, F. (1910):
Untersuchungen über Rachitis und Osteomalazie.
Verlag Gustav Fischer, Jena

REED, J. C. (1994):
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.
J. Cell Biol. 124: 1-6

REYNOLDS, E. S.; KANZ, M. F.; CHIECO, P.; MOSLEN, M. T. (1984):
1,1-Dichloroethylene: an apoptotic hepatotoxin?
Environ. Health Perspect. 57: 313-320

RIEGER, J.; NAUMANN, U.; GLASER, T.; ASHKENAZI, A.; WELLER, M. (1998):
APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma?
FEBS Lett. 427: 124-128

RIZZINO, A. (1988):
Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular
matrices.
Dev. Biol. 130: 411-422

ROBERTS, A. B.; THOMPSON, N. L.; HEINE, U.; FLANDERS, C.; SPORN, M. B.
(1988):
Transforming growth factor- β : possible roles in carcinogenesis.
Br. J. Cancer 57: 594-600

ROBERTS, R. A.; SOAMES, A. R.; GILL, J. H.; JAMES, N. H.; WHEELDON, E. B. (1995):

Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations.

Carcinogenesis 16: 1693-1698

ROFE, A. M.; CONYERS, R. A. J.; BAIS, R.; GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A. (1987):

The effects of recombinant tumour necrosis factor (cachectin) on metabolism in isolated rat adipocyte, hepatocyte and muscle preparations.

Biochem. J. 247: 789-792

ROTELLO, R. J.; LIEBERMANN, R. C.; PURCHIO, A. F.; GERSCHENSON, L. E. (1991):

Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor β 1 in cultured uterine epithelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 3412-3415

ROTHER, M.; WONG, S. C.; HENZEL, W. J.; GOEDDEL, D. V. (1994):

A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain for the 75 kDa tumor necrosis factor receptor.

Cell 78: 681-692

ROUVIER, E.; LUCIANI, M. F.; GOLSTEIN, P. (1993):

Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell-mediated cytotoxicity.

J. Exp. Med. 177: 195-200

ROWINSKY, E. K.; ONETTO, N.; CANETTA, R. M.; ARBUCK, S. G. (1992):

Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents.

Semin. Oncol. 19: 648-662

RUSSELL, S. W.; ROSENAU, W.; LEE, J. C. (1972):

Cytolysis induced by human lymphotoxin.

Am. J. Pathol. 69: 103-118

RUSSELL, W. E.; COFFEY, R. J., Jr.; OUELLETTE, A. J.; MOSES, H. L. (1988):

Type β transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 5126-5130

SACHS, L. (1992):

Angewandte Statistik (7. Aufl.),

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

SATO, T.; HANADA, M.; BODRUG, S.; IRIE, S.; IWAMA, N.; BOISE, L. H.; THOMPSON, C. B.; GOLEMIS, E.; FONG, L.; WANG, H.-G.; REED, J. C. (1994):

Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91: 9238-9242

SAUNDERS, J. W., Jr. (1966):

Death in embryonic systems.

Science 154: 604-612

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; HOGG, N.; HASLETT, C. (1990):

Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.

Nature 343: 170-173

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K. J.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. (1998):

Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.

EMBO J. 17: 1675-1687

SCHLESINGER, P. H.; GROSS, A.; YIN, X.-M.; YAMAMOTO, K.; SAITO, M.; WAKSMAN, G.; KORSMEYER, S. J. (1997):

Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94: 11357-11362

SCHULTE-HERMANN, R. (1974):

Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli.

CRC. Crit. Rev. Toxicol. 3: 97-158

SCHULTE-HERMANN, R.; LANDGRAF, H. (1974):

Circadiane rhythm of cell proliferation in rat liver: synchronization by feeding habits.

Z. Naturforsch. 29c: 421-424

- SCHULTE-HERMANN, R.; LANDGRAF, H.; KORANSKY, W. (1977):
Effect of hypophysectomy on the stimulation of liver growth by a α -hexachlorocyclohexane, phenobarbital, and partial hepatectomy in the rat.
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 298: 137-142
- SCHULTE-HERMANN, R.; HOFFMAN, V.; PARZEFALL, W.; KALLENBACH, M.; GERHARDT, A.; SCHUPPLER, J. (1980):
Adaptive responses of rat liver to the gestagen and anti-androgen cyproterone acetate and other inducers. II. Induction of growth.
Chem.-Biol. Interactions 31: 287-300
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; FESUS, L.; KRAUPP, B. (1988):
Cell death by apoptosis in normal, preneoplastic and neoplastic tissue.
In: Chemical carcinogenesis: Models and mechanisms.: FEO, F.; PANI, P.; COLUMBANO, A.; GARSEA, R. (eds.)
New York; Plenum Press. pp. 263-274
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B.; OBERHAMMER, F.; WAGNER, A.; JIRTLE, R. (1993):
Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci.
Environ. Health Perspect. 101 (Suppl. 5): 87-90
- SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. (1995a):
Apoptosis and hepatocarcinogenesis.
In: Liver regeneration and carcinogenesis - molecular and cellular mechanisms.: JIRTLE, R. L. (ed.)
San Diego: Academic Press. pp. 141-178
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B. (1995b):
Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease.
Prog. Liver Dis. 13: 1-13
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B.; MARIAN, B.; TÖRÖK, L.; KAHL-RAINER, P.; ELLINGER, A. (1997):
Concepts of cell death and application to carcinogenesis.
Toxicol. Pathol. 25: 89-93

SCHUPPLER, J.; GÜNZEL, P. (1979):

Liver tumors and steroid hormones in rats and mice.

Arch. Toxicol. Suppl. 2: 181-195

SCHWEICHEL, J.-U.; MERKER, H.-J. (1973):

The morphology of various types of cell death in prenatal tissues.

Teratology 7: 253-266

SEARLE, J.; LAWSON, T. A.; ABBOTT, P. J.; HARMON, B.; KERR, J. F. R. (1975):

An electron microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells.

J. Pathol. 116: 129-138

SHAHAM, S. (1998):

Identification of multiple *Caenorhabditis elegans* caspases and their potential roles in proteolytic cascades.

J. Biol. Chem. 273: 35109-35117

SHAULSKY, G.; BEN-ZE'EV, A.; ROTTER, V. (1990):

Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells.

Oncogene 5: 1707-1711

SHI, J.; AISAKI, K.; IKAWA, Y.; WAKE, K. (1998):

Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride.

Am. J. Pathol. 153: 515-525

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. (1999):

Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.

Nature 399: 483-487

SHORT, B. G.; ZIMMERMANN, D. M.; SCHWARTZ, L. W. (1997):

Automated double labeling of proliferation and apoptosis in glutathione S-transferase-positive hepatocytes in rats.

J. Histochem. Cytochem. 45: 1299-1305

SIEGEL, R. J.; FISHBEIN, M. C. (1982):

Evaluation of fluorescence microscopy for the identification of necrotic myocardium.

Hum. Pathol. 13: 1091-1094

SLOOP, G. D.; ROA, J. C.; DELGADO, A. G.; BALART, J. T.; HINES, M. O., 3rd;
HILL, J. M. (1999):

Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining.

Arch. Pathol. Lab. Med. 123: 529-532

SMITH, M. L.; YELESWARAPU, L.; SCALAMOGNA, P.; LOCKER, J.; LOMBARDI, B. (1993):

p53 mutations in hepatocellular carcinomas induced by a choline-devoid diet in male Fischer 344 rats.

Carcinogenesis 14: 503-510

STANGER, B. Z.; LEDER, P.; LEE, T-H.; KIM, E.; SEED, B. (1995):

RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death.

Cell 81: 513-523

STEEMANS, M.; GOOSSENS, V.; VAN DE CRAEN, M.; VAN HERREWEGHE, F.;
VANCOMPERNOLLE, K.; DE VOS, K.; VANDENABEELE, P.; GROOTEN, J. (1998):

A caspase-activated factor (CAF) induces mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release by a nonproteolytic mechanism.

J. Exp. Med. 188: 2193-2198

STELLER, H. (1995):

Mechanisms and genes of cellular suicide.

Science 267: 1445-1449

Stephan, H. (2001):

Einfluss fünf verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene auf das Wachstum spontan entstandener präneoplastischer Herde in der Leber alter Wistar Ratten.

Inaugural-Diss. Vet.-Med., Gießen

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCH, K. W.; SCHWARZ, M. (1995):
Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver.
Carcinogenesis 16: 1271-1275

STINCHCOMBE, S. (1996):
Mechanismen der Dioxin-vermittelten Tumorpromotion in der Nagerleber.
Diss. Chemie und Pharmazie, Tübingen

STRAIN, A. J.; FRAZER, A.; HILL, D. J.; MILNER, R. D. G. (1987):
TGF- β inhibits DNA synthesis in hepatocytes isolated from normal and regenerating rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 436-442

STRASSER, A.; HARRIS, A. W.; CORY, C. M. (1991):
Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship.
Cell 67: 889-899

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. (1993):
Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.
Cell 75: 1169-1178

SULSTON, J. E.; SCHIERENBERG, E.; WHITE, J. G.; THOMSON, J. N. (1983):
The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*.
Dev. Biol. 100: 64-119

SUN, X.-M.; MacFARLANE, M.; ZHUANG, J.; WOLF, B. B.; GREEN, D. R.; COHEN, G. M. (1999):
Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis.
J. Biol. Chem. 274: 5053-5060

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; BRENNER, C.; LAROCLETTE, N.; PREVOST, M.-C.; ALZARI, P. M.; KROEMER, G. (1999):
Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process.
J. Exp. Med. 189: 381-394

SWARTZENDRUBER, D. C.; CONGDON, C. C. (1963):

Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen.

J. Cell Biol. 19: 641-646

TALMADGE, J. E.; BOWERSOX, O.; TRIBBLE, H.; LEE, S. H.; SHEPARD, H. M.; LIGGITT, D. (1987):

Toxicity of tumor necrosis factor is synergistic with γ -interferon and can be reduced with cyclooxygenase inhibitors.

Am. J. Pathol. 128: 410-425

TANAKA, M.; SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; NAGATA, S. (1995):

Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes.

EMBO J. 14: 1129-1135

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H. W.; GOEDEL, D. V. (1993a):

A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.

Cell 74: 845-853

TARTAGLIA, L. A.; ROTHE, M.; HU, Y.-F.; GOEDEL, D. V. (1993b):

Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor.

Cell 73: 213-216

TATEYAMA, H.; TADA, T.; HATTORI, H.; MURASE, T.; LI, W. X.; EIMOTO, T. (1998):

Effects of prefixation and fixation times on apoptosis detection by in situ end-labeling of fragmented DNA.

Arch. Pathol. Lab. Med. 122: 252-255

TERRELL, T. G.; WORKING, P. K.; CHOW, C. P.; GREEN, J. D. (1993):

Pathology of recombinant human transforming growth factor- β 1 in rats and rabbits.

Int. Rev. Exp. Pathol. 34B: 43-67

TEWARI, M.; DIXIT, V. M. (1995):

Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product.

J. Biol. Chem. 270: 3255-3260

THOMAS, W. D.; HERSEY, P (1998):

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells.

J. Immunol. 161: 2195-2200

THOMAS, W. D.; ZHANG, X. D.; FRANCO, A. V.; NGUYEN, T.; HERSEY, P. (2000):
TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria.

J. Immunol. 165: 5612-5620

THOMSON, R. K.; ARTHUR, M. J. P. (1999):

Mechanisms of liver cell damage and repair.

Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 11: 949-955

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. (1998):

Caspases: enemies within.

Science 281: 1312-1316

TRAUTH, B. C.; KLAS, C.; PETERS, A. M. J.; MATZKU, S.; MÖLLER, P.; FALK, W.;
DEBATIN, K.; KRAMMER, P. H. (1989):

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.

Science 245: 301-304

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. (1997):

The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis.

Toxicol. Pathol. 25: 82-88

TSUJIMOTO, M.; YIP, Y. K.; VILCEK, J. (1985)

Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 7626-7630

TSUTSUI, H.; MIZOGUCHI, Y.; MORISAWA, S. (1992):

Importance of direct hepatocytolysis by liver macrophages in experimental fulminant hepatitis.

Hepatology 39: 553-559

TUCKER, M. J.; KALINOWSKI, A. E.; ORTON, T. C. (1996):

Carcinogenicity of cyproterone acetate in the mouse.

Carcinogenesis 17: 1473-1476

TURINSKY, J.; BAYLY, B. P.; O'SULLIVAN, D. M. (1991):

1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in rat liver and skeletal muscle *in vivo*.

Am. J. Physiol. 261: E620-E627

TZUNG, S.-P.; FAUSTO, N.; HOCKENBERY, D. M. (1997):

Expression of bcl-2 family during liver regeneration and identification of bcl-x as a delayed early response gene.

Am. J. Pathol. 150: 1985-1995

VALENTE, M.; CALABRESE, F.; THIENE, G.; ANGELINI, A.; BASSO, C.; NAVA, A.; ROSSI, L. (1998):

In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.

Am. J. Pathol. 152: 479-484

VAN ANTWERP, D. J.; MARTIN, S. J.; KAFRI, T.; GREEN, D. R.; VERMA, I. M. (1996):

Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B.

Science 274: 787-789

VAN DEN EIJNDE, S. M.; BOSHART, L.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; DE ZEEUW, C. I.; VERMEJ-KEERS, C. (1997a):

Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry *in vivo*: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis.

Cell Death Diff. 4: 311-316

VAN DEN EIJNDE, S. M.; LUIJSTERBURG, A. J. M.; BOSHART, L.; DE ZEEUW, C. I.; VAN DIERENDONCK, J. H.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; VERMEIJ-KEERS, C. (1997b):

In situ detection of apoptosis during embryogenesis with Annexin V: from whole mount to ultrastructure.

Cytometry 29: 313-320

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. (1998):

Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.

Cytometry 31: 1-9

VAN GIJSSEL, H. E.; MAASSEN, C. B. M.; MULDER, G. J.; MEERMAN, J. H. N. (1997):

p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion.

Carcinogenesis 18: 1027-1033

VAN GIJSSEL, H. E.; VAN GIJLSWIJK, R. P. M.; DE HAAS, R. R.; STARK, C.; MULDER, G. J.; MEERMAN, J. H. N. (1998):

Immunohistochemical visualisation of wild-typ p53 protein in paraffin-embedded rat liver using tyramide amplification: Zonal hepatic distribution of p53 protein after N-hydroxy-2-acetylaminofluorene administration.

Carcinogenesis 19: 219-222

VARFOLOMEEV, E. E.; BOLDIN, M. P.; GONCHAROV, T. M.; WALLACH, D. A. (1996):

A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other.

J. Exp. Med. 183: 1271-1275

VAUX, D. L.; CORY, S.; ADAMS, J. M. (1988):

Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.

Nature 335: 440-442

VAUX, D. L.; WEISSMAN, I. L.; KIM, S. K. (1992):

Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2.

Science 258: 1955-1957

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. (1995):

A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.

J. Immunol. Meth. 184: 39-51

VIGNAUX, F.; GOLSTEIN, P. (1994):

Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway?

Eur. J. Immunol. 24: 923-927

VIRCHOW, R. (1871):

Die Zellulärpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre.

2. Auflage, Hirschwald, Berlin, zitiert nach WYLLIE et al., 1980

VOGT, C. (1842):

Untersuchungen bei der Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*).

Jent und Gassmann, Solothurn, zitiert nach WYLLIE et al., 1980

WAKEFIELD, L. M.; WINOKUR, T. S.; HOLLANDS, R. S.; CHRISTOPHERSON, K.; LEVINSON, A. D.; SPORN, M. B. (1990):

Recombinant latent transforming growth factor β 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor β 1, and a different tissue distribution.

J. Clin. Invest. 86: 1976-1984

WALTER, J. B.; ISRAEL, M. S. (1974):

„General Pathology“, 4th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh and London, p. 67,

WANG, C.-Y.; MAYO, M. W.; BALDWIN, A. S., Jr. (1996):

TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF- κ B.

Science 274: 784-787

WANG, J.; WENDEL, A. (1990):

Studies on the hepatotoxicity of galactosamine/endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver.

Biochem. Pharmacol. 39: 267-270

WATANABE-FUKUNAGA, R.; BRANNAN, C. I.; ITOH, N.; YONEHARA, S.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; NAGATA, S. (1992):

The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen.

J. Immunol. 148: 1274-1279

WEBER, R. (1969):

In: Lysosomes in Biology and Pathology. Vol. 2: DINGLE, J. T.; FELL, H. B. (eds.) North-Holland, Amsterdam p. 437

WEEDON, D.; SEARLE, J.; KERR, J. F. R. (1979):

Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology.

Am. J. Dermatopathol. 1: 133-144

WHEELDON, E. B.; WILLIAMS, S. M.; SOAMES, A. R.; JAMES, N. H.; ROBERTS, R. A. (1995):

Quantitation of apoptotic bodies in rat liver by *in situ* end labeling (ISEL): correlation with morphology.

Toxicol. Pathol. 23: 410-415

WIJSMAN, J. H.; JONKER, R. R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J. H.; CORNELISSE, C. J.; VAN DIERENDONCK, J. H. (1993):

A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labeling of fragmented DNA .

J. Histochem. Cytochem. 41: 7-12

WILEY, S. R.; SCHOOLEY, K.; SMOLAK, P. J.; DIN, W. S.; HUANG, C.-P.; NICHOLL, J. K.; SUTHERLAND, G. R.; SMITH, T. D.; RAUCH, C.; SMITH, C. A.; GOODWIN, R. G. (1995):

Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.

Immunity 3: 673-682

WONG, G. H. W.; ALEXANDER, K.; ELWELL, J. H.; OBERLEY, L. W.; GOEDEL, D. V. (1988):

MnSOD induction by TNF and its protective role.

In: Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine. B. BEUTLER (ed.) Raven Press, Ltd., New York, pp. 473-484

WOODS, K. M.; CHAPES, S. K. (1993):

Three distinct cell phenotypes of induced-TNF cytotoxicity and their relationship to apoptosis.

J. Leukoc. Biol. 53: 37-44

WRONE-SMITH, T.; MITRA, R. S.; THOMPSON, C. B.; JASTY, R.; CASTLE, V. P.; NICKOLOFF, B. J. (1997):

Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin.

Am. J. Pathol. 151: 1321-1329

WYLLIE, A. H. (1980):

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.

Nature 284: 555-556

WYLLIE, A. H. (1987):

Cell death.

Int. Rev. Cytol. (Suppl.) 17: 755-785

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. (1980):

Cell death: the significance of apoptosis.

Int. Rev. Cytol. 68: 251-306

XIONG, Y.; HANNON, G. J.; ZHANG, H.; CASSO, D.; KOBAYASHI, R.; BEACH, D. (1993):

p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.

Nature 366: 701-704

YAMADA, H.; TADA-OIKAWA, S.; UCHIDA, A.; KAWANISHI, S. (1999):

TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 130-133

YAMADORI, I.; YOSHINO, T.; KONDO, E.; CAO, L.; AKAGI, T.; MATSUO, Y.; MINOWADA, J. (1998):

Comparison of two methods of staining apoptotic cells of leukemia cell lines: terminal deoxynucleotidyl transferase and DNA Polymerase I reactions.

J. Histochem. Cytochem. 46: 85-90

YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L. H.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. (1995):

Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.

Cell 80: 285-291

YANG, F.; SUN, X.; BEECH, W.; TETER, B.; WU, S.; SIGEL, J.; VINTERS, H. V.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M. (1998):

Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease.

Am. J. Pathol. 152: 379-389

YIN, X.-M.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. (1994):

BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.

Nature 369: 321-323

YIN, X.-M. (2000):

Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes.

J. Mol. Med. 78: 203-211

YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M. (1989):

A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.

J. Exp. Med. 169: 1747-1756

YUAN, J.; HORVITZ, H. R. (1990):

The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death.

Dev. Biol. 138: 33-41

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. (1993):

The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme.

Cell 75: 641-652

ZAJICEK, G.; OREN, R.; WEINREB, M., Jr. (1985):

The streaming liver.

Liver 5: 293-300

ZAKERI, Z.; QUAGLINO, D.; LATHAM, T.; WOO, K.; LOCKSHIN, R. A. (1996):

Programmed cell death in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: alteration in protein synthesis.

Microsc. Res. Tech. 34: 192-201

ZHANG, X. D.; FRANCO, A.; MYERS, K.; GRAY, C.; NGUYEN, T.; HERSEY, P. (1999):

Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma.

Cancer Res. 59: 2747-2753

ZHAO, M.; LAISSUE, J. A.; ZIMMERMANN, A. (1997):

TUNEL-positive hepatocytes in alcoholic liver disease.

Virchows Arch. 431: 337-344

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Prof. Manfred Reinacher für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und für die Überlassung des Themas danken. Sehr geholfen hat seine bereitwillige und geduldige Unterstützung insbesondere bei der Vorbereitung der statistischen Bewertung, zahlreiche gute Tipps sowie seine kritische Durchleuchtung der Arbeit. Zeitlich und thematisch über den Rahmen der Dissertation hinausgehend fand ich in ihm zudem einen entgegenkommenden Ansprechpartner bei der Klärung fachlicher Fragen.

Herrn Dr. Bahnemann danke ich ebenfalls für die Bereitstellung des Themas, der Betreuung während der Arbeit am praktischen Teil sowie der Erstkorrektur.

Der Abteilung Toxikologie der BASF-AG Ludwigshafen – hierbei insbesondere Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Gelbke, Herrn Dr. Gembardt und Frau Dr. Birgit Kittel, möchte ich aufgrund der gewährten finanziellen Unterstützung, der theoretischen und praktischen Hilfe sowie der freundschaftlichen Aufnahme im Hause meinen herzlichen Dank aussprechen. Herr Dr. Gembardt war und ist auch über diesen Betreuungszeitraum hinaus in seiner sympathischen Art bereit aufmunternde Worte zu gewähren und "pathologische Probleme" zu lösen. Weiterhin hat mir seine Hilfe bei der Kontaktherstellung zu anderen Autoren sehr geholfen.

Auch weiteren Mitarbeitern der Abteilung Toxikologie der BASF-AG – vor allem der Pathologie, Histologie, Bibliothek und EDV - möchte ich für gute Zusammenarbeit danken.

Hervorheben möchte ich hier das Labor für ultrastrukturelle Pathologie "USP-Labor" mit Frau Inta Kögel, Frau Andrea Keil, Herrn Stefan Tresch und Herrn Marco Gerst und das "ZIP-Labor" (Labor für Zellproliferation und Immunpathologie) mit den Herren Hans-Robert Hofmann und Thomas Tatarewicz, die für viele Probleme eine schnelle Lösung parat hatten, mit Rat und Tat nicht geizten und mir in allen Produktionsphasen eine ständige Unterstützung und Freundschaft boten. Hilfreich waren auch die "Rauchpausen" mit Hans-Robert Hofmann.

Gleichfalls gilt mein Dank dem unermüdlichen und bewundernswerten Einsatz von Dr. Failing und Herrn Heiter aus dem Institut der Biomathematik der Justus-Liebig-Universität bei der statistischen Analyse meiner Arbeit und der Erstellung der Graphiken. Unbeirrt und geduldig haben sie meine unzähligen Fragen beantwortet und mir die Analysearbeit verständlich dargelegt.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern vom Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die Führung beim Einstieg in die Veterinär-Pathologie und Diagnostik. Die Krisensituationen zwischen dem Computer und mir konnte insbesondere Herr Kernt Köhler immer mit einem Lächeln lösen. Den vielen Mitdoktoranden/Innen möchte ich für die ständige Unterstützung bei vielen Problemen, die Freundschaft, das Lachen und die Rücksichtnahme danken.

Inta und Karl Kögel boten mir in ihrer heimatlichen Oase in den Weinbergen von Kallstadt mit ihrem Lachen und ihrer Lebendigkeit die notwendige Entspannung. Fröhliche Grillabende, Spaziergänge – auch mit den "Mädels" Cocco und Laura – sowie andere Freizeitaktivitäten mit ihnen schafften mir Ausgleich, innere Ruhe und Frohsinn.

Ein großes Dankeschön – nicht an letzter Stelle – geht an meine Familie, vor allem meine Mutter, meine Schwestern und meinen Schwager, die an die Beendigung der vorliegenden Arbeit nicht zweifelten und mich hierbei unterstützten. Danke auch an Werner Steinmaier, der die Ordner und den Computer an die ständig wechselnden Wohnorte schleppte, und an Nicole und Bernd, die mir freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite standen.